KOMISIJOS ĮGYVENDINIMO REGLAMENTAS (ES) 2019/1604

2019 m. rugsėjo 27 d.

kuriuo iš dalies keičiamas Reglamentas (EEB) Nr. 2568/91 dėl maišyto alyvuogių aliejaus ir maišyto alyvuogių išspaudų aliejaus savybių ir dėl atitinkamų analizės metodų

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2013 m. gruodžio 17 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (ES) Nr. 1308/2013, kuriuo nustatomas bendras žemės ūkio produktų rinkų organizavimas ir panaikinami Tarybos reglamentai (EEB) Nr. 922/72, (EEB) Nr. 234/79, (EB) Nr. 1037/2001 ir (EB) Nr. 1234/2007 ([1]), ypač į jo 91 straipsnio pirmos pastraipos d punktą,

kadangi:

(1) Komisijos reglamente (EEB) Nr. 2568/91 ([2]) apibrėžiamos fizinės ir cheminės bei organoleptinės alyvuogių aliejaus ir alyvuogių išspaudų aliejaus savybės ir nustatomi tų savybių vertinimo metodai;

(2) metodai ir aliejų savybėms taikomos ribinės vertės reguliariai atnaujinami remiantis chemijos ekspertų nuomone ir atsižvelgiant į Tarptautinėje alyvuogių taryboje (TAT) atliktus darbus;

(3) siekiant užtikrinti, kad Sąjungos lygmeniu būtų įgyvendinami naujausi TAT nustatyti tarptautiniai standartai, reikėtų atnaujinti tam tikrus Reglamente (EEB) Nr. 2568/91 nustatytus analizės metodus;

(4) IOC prekybos standartas buvo iš dalies pakeistas dėl laisvųjų rūgščių kiekio ir peroksidų skaičiaus ribų, organoleptinio vertinimo (trūkumų medianos ir vaisių požymio medianos) ir ECN42 (HPLC metodas) bei ECN42 (teorinis apskaičiavimas) skirtumo, kad atitiktų analizės metodų tikslumo vertes;

(5) pagal Reglamento (EEB) Nr. 2568/91 2a straipsnio 5 dalį valstybės narės bet kokia eilės tvarka arba to reglamento Ib priede pateikiamoje sprendimų schemoje nurodyta tvarka tikrindamos jo I priede nustatytas savybes turi patikrinti, ar alyvuogių aliejaus mėginys atitinka deklaruotą kategoriją;

(6) atsižvelgiant į naujausius pokyčius, tikslinga tinkamai atnaujinti Reglamento (EEB) Nr. 2568/91 Ib priedo lenteles ir jo priedėlį. Be to, atsižvelgiant į Ib priedo turinį, terminas „struktūrinė schema“ atrodo tinkamesnis už terminą „sprendimų schema“;

(7) Reglamento (EEB) Nr. 2568/91 XII priedo 9.4 punkte nustatyta, kad trūkumų mediana yra stipriausiai pajusto trūkumo mediana. Atliekant priešpriešinius vertinimus ir atsižvelgiant į tai, kad aliejaus atitiktį turi vertinti įvairios degustuotojų grupės, reikėtų paaiškinti, kad sprendimas dėl aliejaus savybių atitikties deklaruotos kategorijos savybėms susijęs tik su pagrindinio trūkumo medianos verte, nepriklausomai nuo jo pobūdžio;

(8) todėl Reglamentas (EEB) Nr. 2568/91 turėtų būti atitinkamai iš dalies pakeistas;

(9) šiame reglamente nustatytos priemonės atitinka Bendro žemės ūkio rinkų organizavimo komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Reglamentas (EEB) Nr. 2568/91 iš dalies keičiamas taip:

1) 2 straipsnis iš dalies keičiamas taip:

a) 1 dalies l punktas pakeičiamas taip:

„l) sterolių sudėčiai ir kiekiui nustatyti ir alkoholio junginiams nustatyti – XIX priede nustatytu kapiliarinės dujų chromatografijos metodu;“

([1]) OL L 347, 2013 12 20, p. 671.

([2]) 1991 m. liepos 11 d. Komisijos reglamentas (EEB) Nr. 2568/91 dėl maišyto alyvuogių aliejaus ir maišyto alyvuogių išspaudų aliejaus savybių ir dėl atitinkamų analizės metodų (OL L 248, 1991 9 5, p. 1).

b) 2 dalies trečia pastraipa pakeičiama taip:

„Jeigu degustuotojų grupė, įvertinusi organoleptines savybes, nepatvirtina deklaruotos kategorijos, suinteresuotosios šalies prašymu nacionalinės institucijos arba jų atstovai nedelsdami surengia du priešpriešinius vertinimus, kuriuos atlieka kitos patvirtintos degustuotojų grupės. Bent viena iš jų turi būti susijusios valstybės narės gamintojos patvirtinta degustuotojų grupė. Atitinkamos savybės laikomos derančiomis su deklaruotomis savybėmis, jeigu deklaruotą kategoriją patvirtina abu priešpriešiniai vertinimai. Priešingu atveju, nepriklausomai nuo to, kokie defektai nustatyti atliekant priešpriešinius vertinimus, skelbiama, kad aliejus neatitinka deklaruotos kategorijos, ir suinteresuotoji šalis padengia priešpriešinių vertinimų išlaidas.“;

2) 2a straipsnio 5 dalies b punktas pakeičiamas taip:

„b) laikydamosi Ib priedo struktūrinėje schemoje nustatytos eilės tvarkos, kol priimamas vienas iš toje schemoje nurodytų sprendimų.“;

3) Lentelė „PRIEDAI. Turinys“ pakeičiama šio reglamento I priede pateikta lentele;

4) I priedas pakeičiamas šio reglamento II priedo tekstu;

5) Ia priedo 2.1 punktas pakeičiamas taip:

„2.1. Kiekvienas pirminis mėginys pagal standarto EN ISO 5555 2.5 punktą turi būti padalytas į laboratorinius mėginius ir išanalizuotas Ib priede pateikiamoje struktūrinėje schemoje nurodyta eilės tvarka arba bet kokia kita atsitiktine tvarka.“;

6) Ib priedas pakeičiamas šio reglamento III priedo tekstu;

7) V priedas išbraukiamas;

8) VII priedo 4.2 punktas pakeičiamas taip:

„4.2. n-heksanas (tinkamas chromatografijai). Heksanas gali būti keičiamas izooktanu (2,2,4-trimetilpentanas, tinkamas chromatografijai), jei gaunamos panašaus tikslumo vertės.“;

9) XII priedas iš dalies keičiamas pagal šio reglamento IV priedą;

10) XVII priedas iš dalies keičiamas pagal šio reglamento V priedą;

11) XVIII priedas iš dalies keičiamas pagal šio reglamento VI priedą;

12) XIX priedas pakeičiamas šio reglamento VII priedo tekstu;

13) XX priedo 4.2 punktas pakeičiamas taip:

„4.2. n-heksanas, tinkamas chromatografijai arba likučių analizei. Heksanas gali būti keičiamas izooktanu (2,2,4-trimetilpentanas, tinkamas chromatografijai), jei gaunamos panašaus tikslumo vertės. Tirpikliai, kurių virimo temperatūra yra aukštesnė negu n-heksano, išgaruoja lėčiau. Tačiau dėl heksano toksiškumo jiems teikiama pirmenybė. Turi būti patikrintas grynumas, pavyzdžiui, gali būti tikrinamas likutis išgarinus 100 ml tirpiklio.

ĮSPĖJIMAS – Garai gali užsidegti. Laikykite juos atokiai nuo šilumos šaltinių, kibirkščių ar atviros liepsnos. Pasirūpinkite, kad buteliukai visuomet būtų tinkamai uždaryti. Naudojimo metu užtikrinkite tinkamą vėdinimą. Venkite garų susikaupimo ir pašalinkite visus gaisrą sukelti galinčius daiktus, tokius kaip šildytuvai ar elektros prietaisai, kurie nėra pagaminti iš nedegių medžiagų. Žalingi įkvėpus, nes gali pažeisti nervų ląsteles. Stenkitės neįkvėpti garų. Jei reikia, naudokite tinkamus kvėpavimo aparatus. Stenkitės, kad jų nepatektų į akis arba ant odos.

Izooktanas yra degus skystis, keliantis gaisro pavojų. Sprogumo ore ribos yra 1,1–6,0 % (tūrinis procentas). Prarytas ar įkvėptas yra toksiškas. Dirbdami su šiuo tirpikliu naudokite gerai veikiančią ventiliuojamą traukos spintą.“

2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja dvidešimtą dieną po jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2019 m. rugsėjo 27 d.

Komisijos vardu
Pirmininkas
Jean-Claude JUNCKER

I PRIEDAS

„PRIEDAI

SANTRAUKA

I priedas	Alyvuogių aliejaus savybės
Ia priedas	Alyvuogių aliejaus arba alyvuogių išspaudų aliejaus, pristatyto pirminėje pakuotėje, mėginių ėmimas
Ib priedas	Struktūrinė schema siekiant patikrinti, ar alyvuogių aliejaus mėginys atitinka deklaruotą kategoriją
II priedas	Laisvųjų riebalų rūgščių kiekio nustatymas šaltuoju metodu
III priedas	Peroksidų skaičiaus nustatymas
IV priedas	Vaškų kiekio nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu
VII priedas	2-glicerilo monopalmitato procentinės dalies nustatymas
IX priedas	Spektrofotometrinis tyrimas ultravioletinėje spektro dalyje
X priedas	Riebalų rūgščių metilesterių nustatymas dujų chromatografijos metodu
XI priedas	Lakiųjų halogenintų tirpiklių kiekio alyvuogių aliejuje nustatymas
XII priedas	Tarptautinės alyvuogių aliejaus tarybos gryno alyvuogių aliejaus organoleptinio vertinimo metodas
XV priedas	Aliejaus kiekio alyvuogių atliekose nustatymas
XVI priedas	Jodo skaičiaus nustatymas
XVII priedas	Augaliniuose aliejuose esančių stigmastadienų nustatymo metodas
XVIII priedas	Skirtumo tarp faktinio ir teorinio triacilglicerolių kiekio su ECN 42 nustatymas
XIX priedas	Sterolių sudėties bei kiekio ir alkoholio junginių nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu
XX priedas	Vaškų, riebalų rūgščių metilesterių ir riebalų rūgščių etilo esterių kiekio nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu
XXI priedas	8 straipsnio 2 dalyje nurodytų alyvuogių aliejaus atitikties patikrų rezultatai“

II PRIEDAS

„*I PRIEDAS*

ALYVUOGIŲ ALIEJAUS SAVYBĖS

Kokybės rodikliai

Kategorija	Rūgštingumas (%) (*)	Peroksidų skaičius (mekv. O_2/kg)	K_{232}	K_{268} arba K_{270}	Delta-K	Organoleptinis vertinimas		Riebalų rūgščių etilo esteriai (mg/kg)
						Trūkumų mediana (Md) (*)	Vaisių požymio mediana (Mf)	
1. Ypač grynas alyvuogių aliejus	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Grynas alyvuogių aliejus	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Klasikinis alyvuogių aliejus („lampante“)	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 [1]	—	—
4. Rafinuotas alyvuogių aliejus	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Alyvuogių aliejus, sudarytas iš rafinuoto alyvuogių aliejaus ir gryno alyvuogių aliejaus	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Neapdorotas alyvuogių išspaudų aliejus	—	—	—	—	—		—	—
7. Rafinuotas alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

[1] Trūkumų mediana gali būti mažesnė arba lygi 3,5, jei vaisių požymio mediana lygi 0,0.

Grynumo rodikliai

Kategorija	Riebalų rūgščių sudėtis (1)						Bendras transoleino izomerų kiekis (%)	Bendras translinolo ir translinoleno izomerų kiekis (%)	Stigmastadienai (mg/kg) (2)	ECN42 (HPLC metodas) ir ECN42 (teorinis apskaičiavimas) skirtumas	2-glicerilo monopalmitatas (%)
	Miristo (%)	Linoleno (%)	Eikozano (%)	Eikozeno (%)	Beheno (%)	(%)					
1. Ypač grynas alyvuogių aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14,00 % ≤ 1,0, jei bendras palmitino rūgšties % > 14,00 %
2. Grynas alyvuogių aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14,00 % ≤ 1,0, jei bendras palmitino rūgšties % > 14,00 %
3. Klasikinis alyvuogių aliejus („lampante“)	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14,00 % ≤ 1,1, jei bendras palmitino rūgšties % > 14,00 %
4. Rafinuotas alyvuogių aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14,00 % ≤ 1,1, jei bendras palmitino rūgšties % > 14,00 %
5. Alyvuogių aliejus, sudarytas iš rafinuoto alyvuogių aliejaus ir gryno alyvuogių aliejaus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14,00 % ≤ 1,0, jei bendras palmitino rūgšties % > 14,00 %
6. Neapdorotas alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Rafinuotas alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

(1) Kitos riebalų rūgštys (%): palmitino: 7,50–20,00; palmitoleino: 0,30–3,50; heptadekano: ≤ 0,40; heptadeceno: ≤ 0,60; stearino: 0,50–5,00; oleino: 55,00–83,00; linolo: 2,50–21,00.

(2) Bendras izomerų, kurie galėtų (arba negalėtų) būti atskirti kapiliarine kolonėle, kiekis.

Kategorija	Sterolių sudėtis						Bendras sterolių kiekis (mg/kg)	Eritrodiolis ir uvaolis (%) (**)	Vaškai (mg/kg) (**)
	Cholesterolis (%)	Brasikasterolis (%)	Kampesterolis (1) (%)	Stigmasterolis (%)	Tariamasis β-sitosterolis (2) (%)	Delta-7-stigmastenolis (1) (%)			
1. Ypač grynas alyvuogių aliejus	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Grynas alyvuogių aliejus	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Klasikinis alyvuogių aliejus („lampante“)	≤ 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. Rafinuotas alyvuogių aliejus	≤ 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. Alyvuogių aliejus, sudarytas iš rafinuoto alyvuogių aliejaus ir gryno alyvuogių aliejaus	≤ 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. Neapdorotas alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 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. Rafinuotas alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 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. Alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 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) Žr. šio priedo priedėlį.

(2) Tariamasis β-sitosterolis: delta-5,23-stigmastadienolis + klerosterolis + beta-sitosterolis + sitostanolis + delta-5-avenasterolis + delta-5,24-stigmastadienolis.

(3) Aliejai, kuriuose yra nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vaškų, laikomi klasikiniais alyvuogių aliejais „lampante“, jei bendras alifatinių alkoholių kiekis yra ne didesnis nei 350 mg/kg arba jei eritrodiolio ir uvaolio procentinė dalis yra ne didesnė nei 3,5 %.

(4) Aliejai, kuriuose yra nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vaškų, laikomi neapdorotais alyvuogių išspaudų aliejais, jei bendras alifatinių alkoholių kiekis yra didesnis nei 350 mg/kg ir jei eritrodiolio ir uvaolio procentinė dalis yra didesnė nei 3,5 %.

Pastabos:

a) Analizės rezultatai turi būti pateikti tokiu tikslumu po kablelio, kaip nustatyta kiekvienai savybei. Apvalinant rezultatą nustatytu tikslumu, paskutinis skaitmuo yra didinamas vienetu, jei po jo einantis skaitmuo didesnis už 4.

b) Aliejus gali būti priskirtas kitai kategorijai arba paskelbtas neatitinkančiu šiame reglamente nustatytų reikalavimų net ir tuo atveju, jei nustatytų verčių neatitinka tik vienas rodiklis.

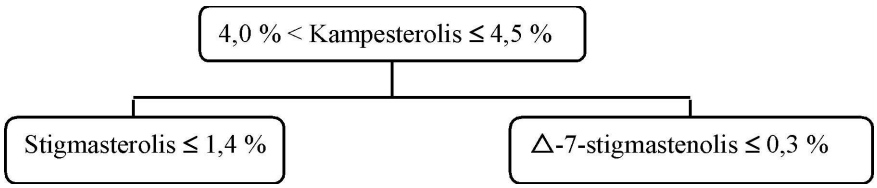
c) Abu žvaigždute (*) pažymėti klasikinio alyvuogių aliejaus („lampante“) kokybės rodikliai vienu metu gali skirtis nuo šiai kategorijai nustatytų ribinių verčių.

d) Dviem žvaigždutėmis (**) pažymėtas rodiklis reiškia, kad neapdorotas alyvuogių išspaudų aliejus nebūtinai vienu metu turi atitikti abi nustatytas ribines vertes. Viena iš atitinkamų ribinių alyvuogių išspaudų aliejaus ir rafinuoto alyvuogių išspaudų aliejaus verčių gali skirtis nuo nustatytų verčių.

Priedėlis

Sprendimų medis

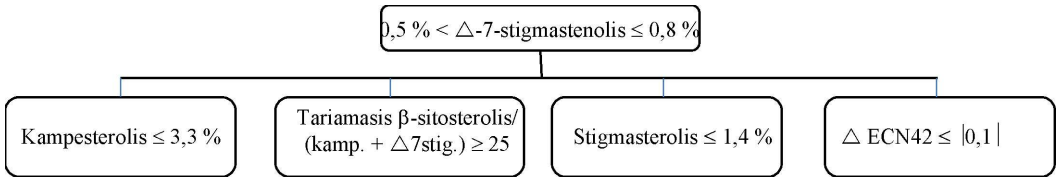
Kampesterolis. Sprendimų medis. Grynas alyvuogių aliejus ir ypač grynas alyvuogių aliejus



Kiti parametrai turi atitikti šiame reglamente nustatytas ribines vertes.

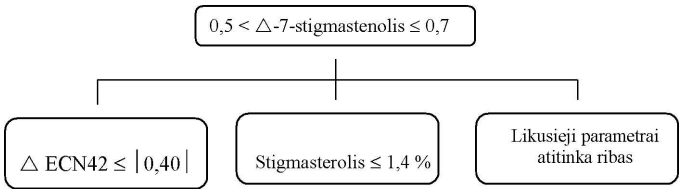
Delta-7-stigmastenolis. Sprendimų medis.

— Ypač grynas alyvuogių aliejus ir grynas alyvuogių aliejus.



Kiti parametrai turi atitikti šiame reglamente nustatytas ribines vertes.

— Alyvuogių išspaudų aliejai (neapdoroti ir rafinuoti)



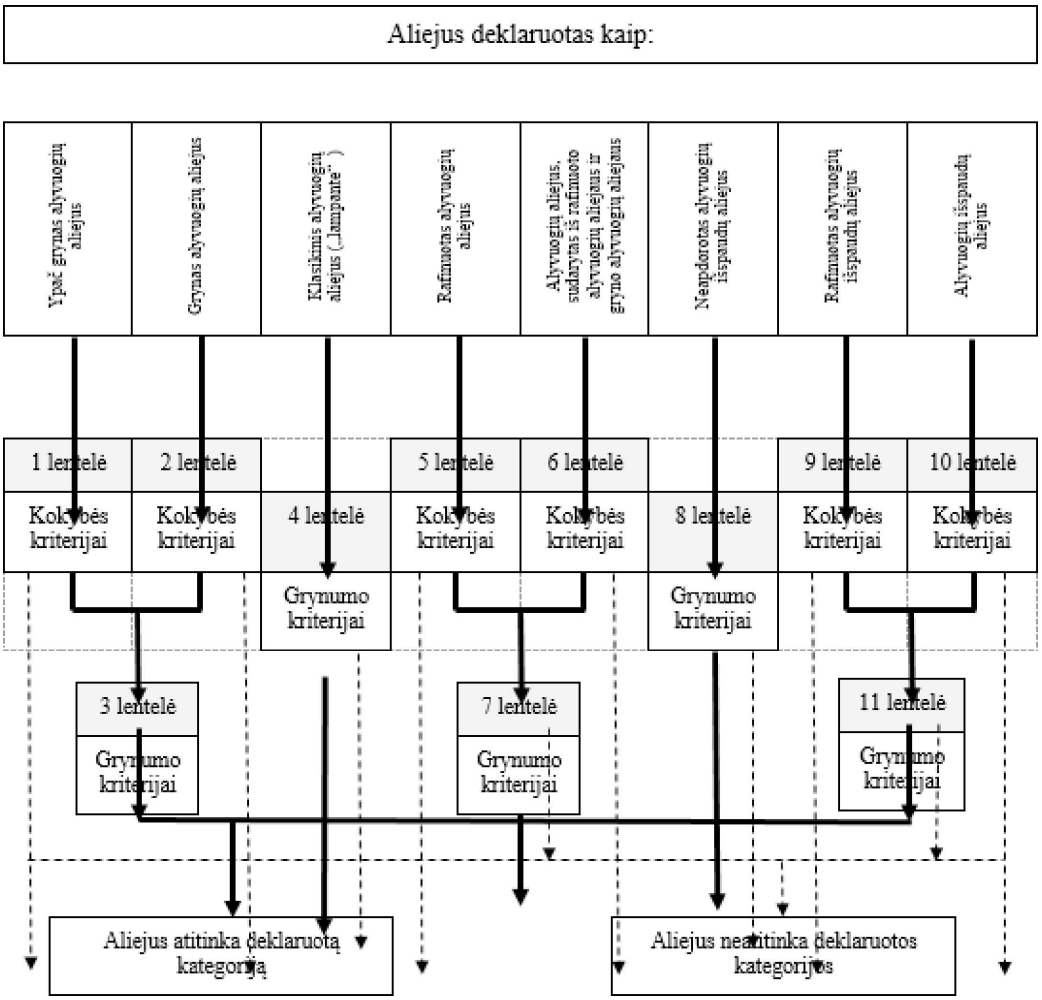
Kiti parametrai turi atitikti šiame reglamente nustatytas ribines vertes.“

III PRIEDAS

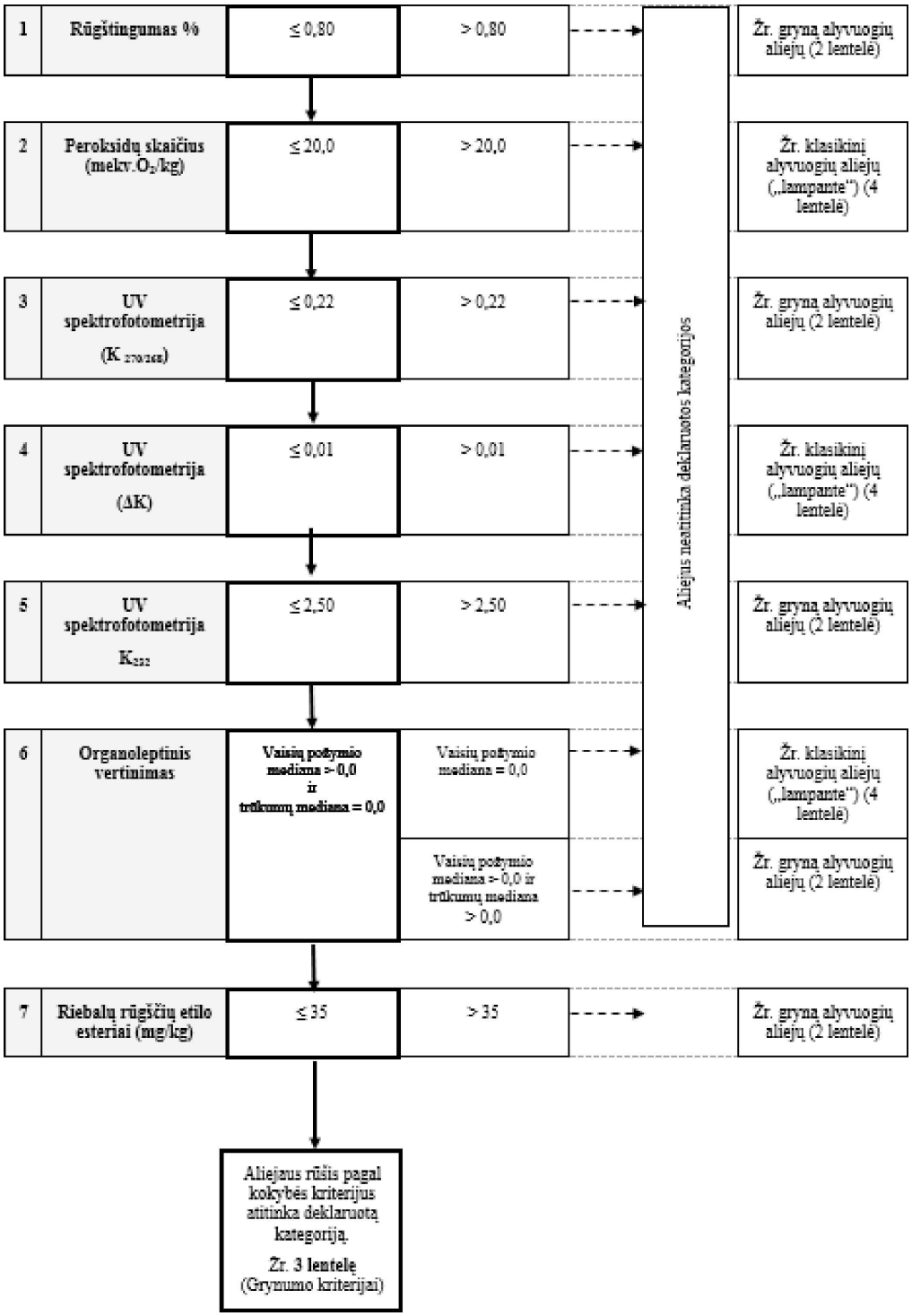
„Ib PRIEDAS

STRUKTŪRINĖ SCHEMA SIEKIANT PATIKRINTI, AR ALYVUOGIŲ ALIEJAUS MĖGINYS ATITINKA DEKLARUOTĄ KATEGORIJĄ

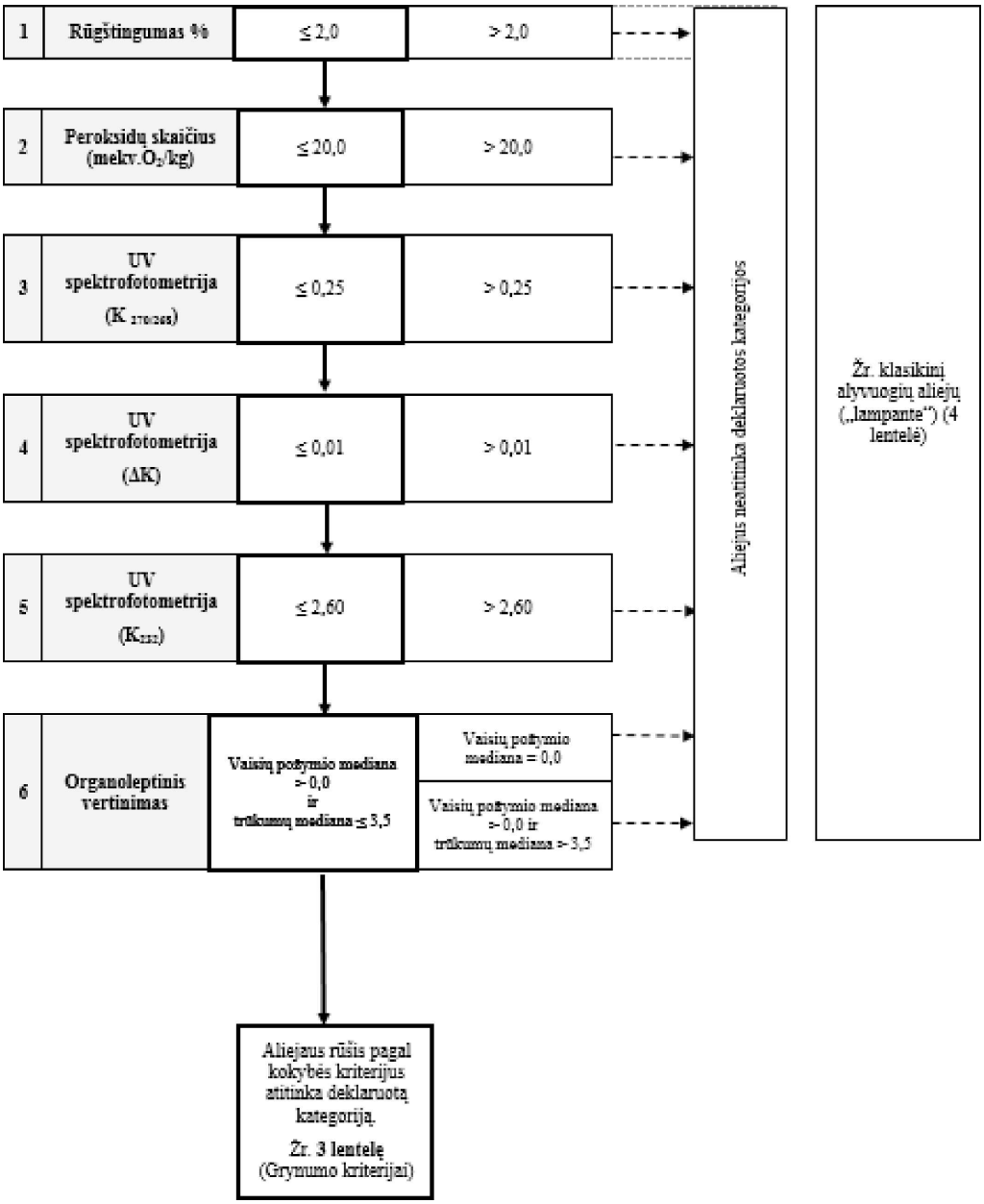
Bendroji lentelė



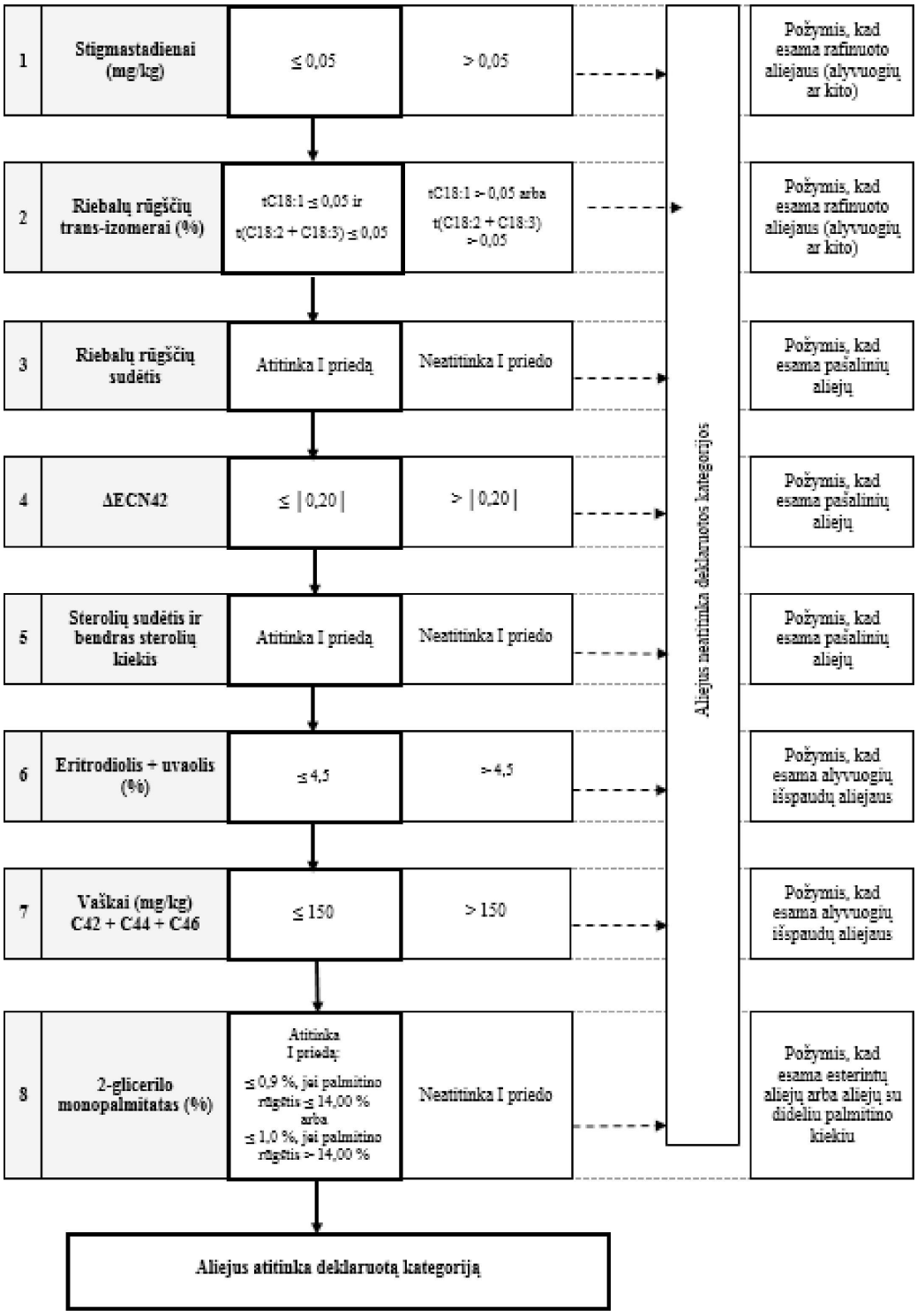
1 lentelė. Ypač grynas alyvuogių aliejus. Kokybės kriterijai



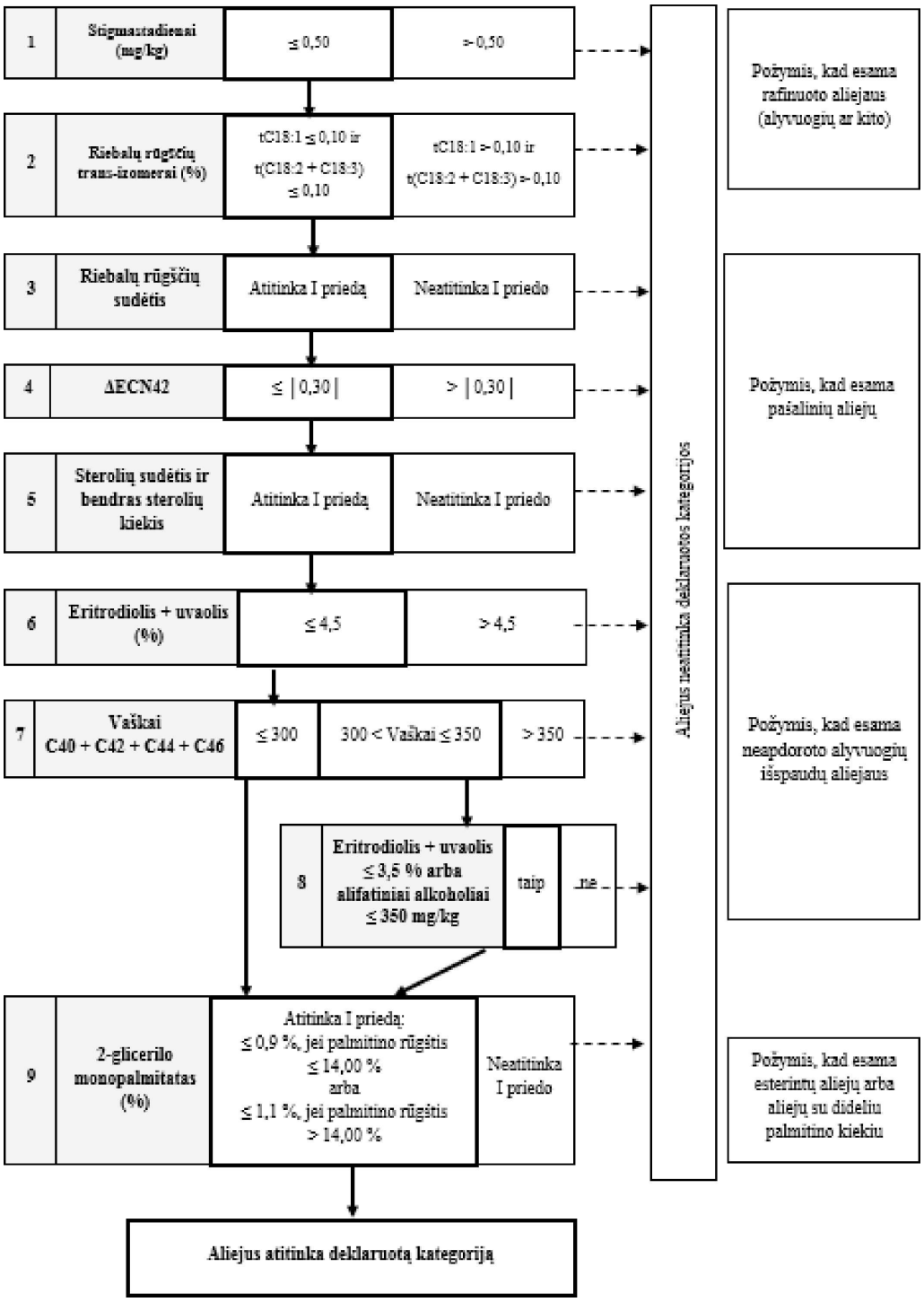
2 lentelė. Grynas alyvuogių aliejus. Kokybės kriterijai



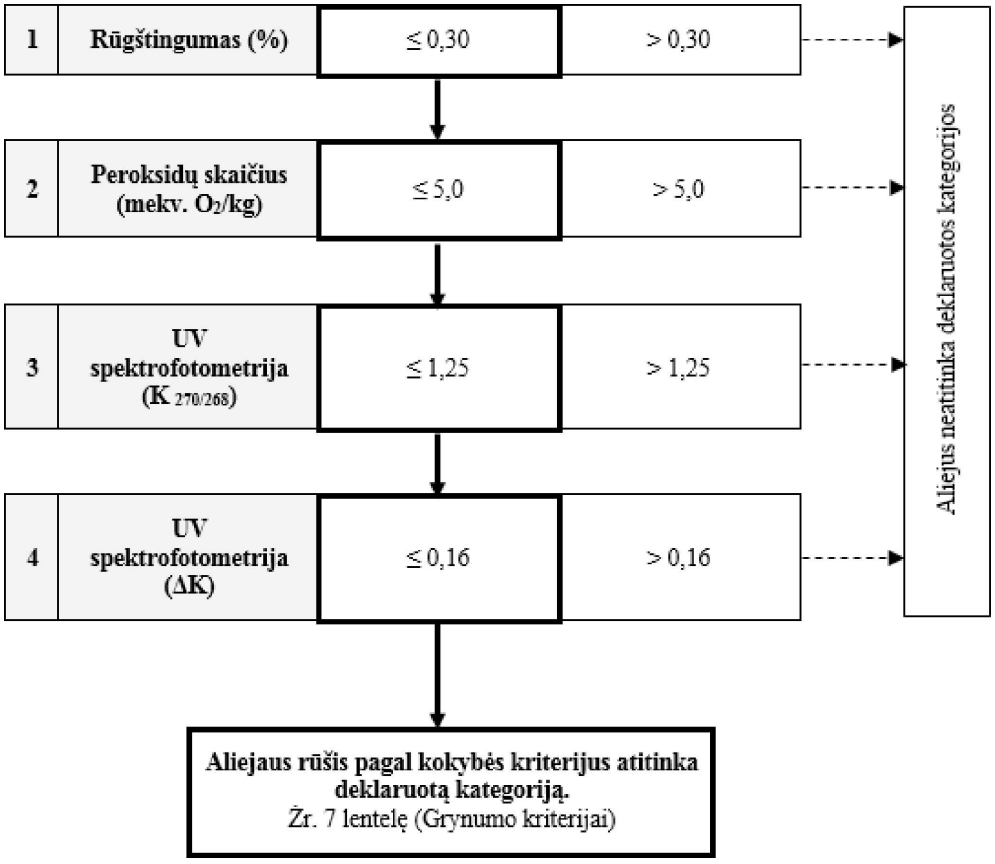
3 lentelė. Ypač grynas alyvuogių aliejus ir grynas alyvuogių aliejus. Grynumo kriterijai



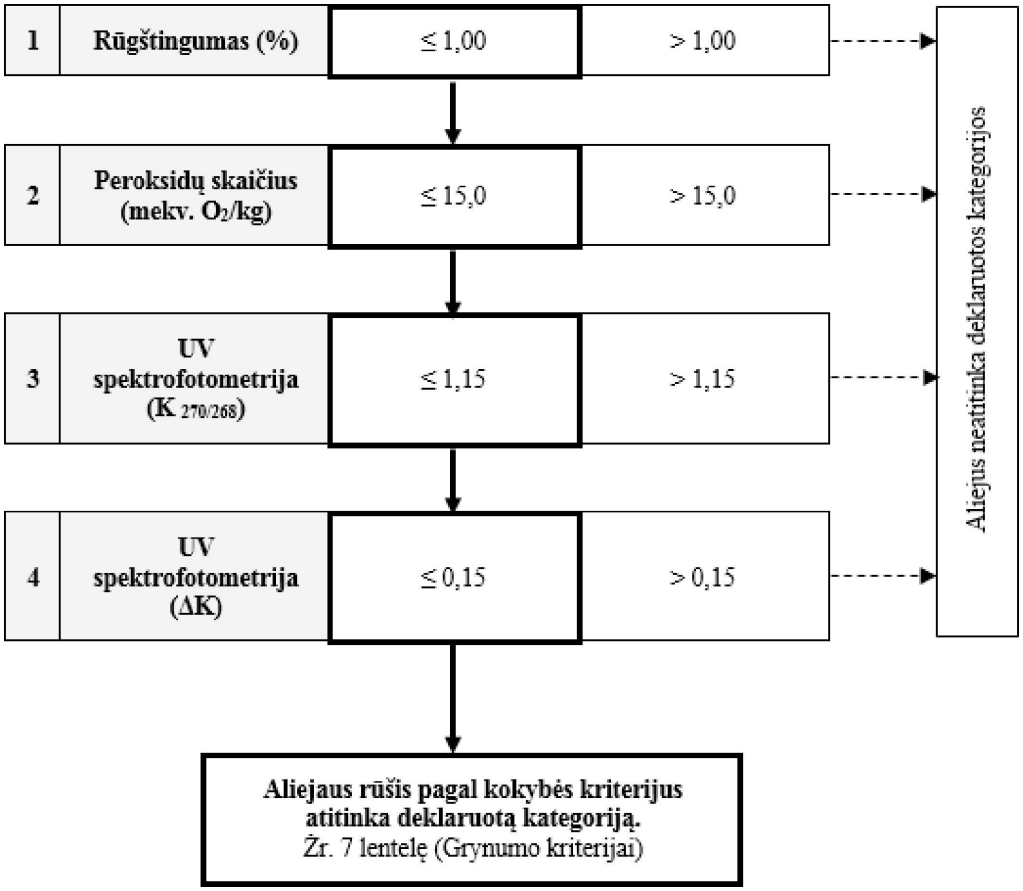
4 lentelė. Klasikinis alyvuogių aliejus („lampante“). Grynumo kriterijai



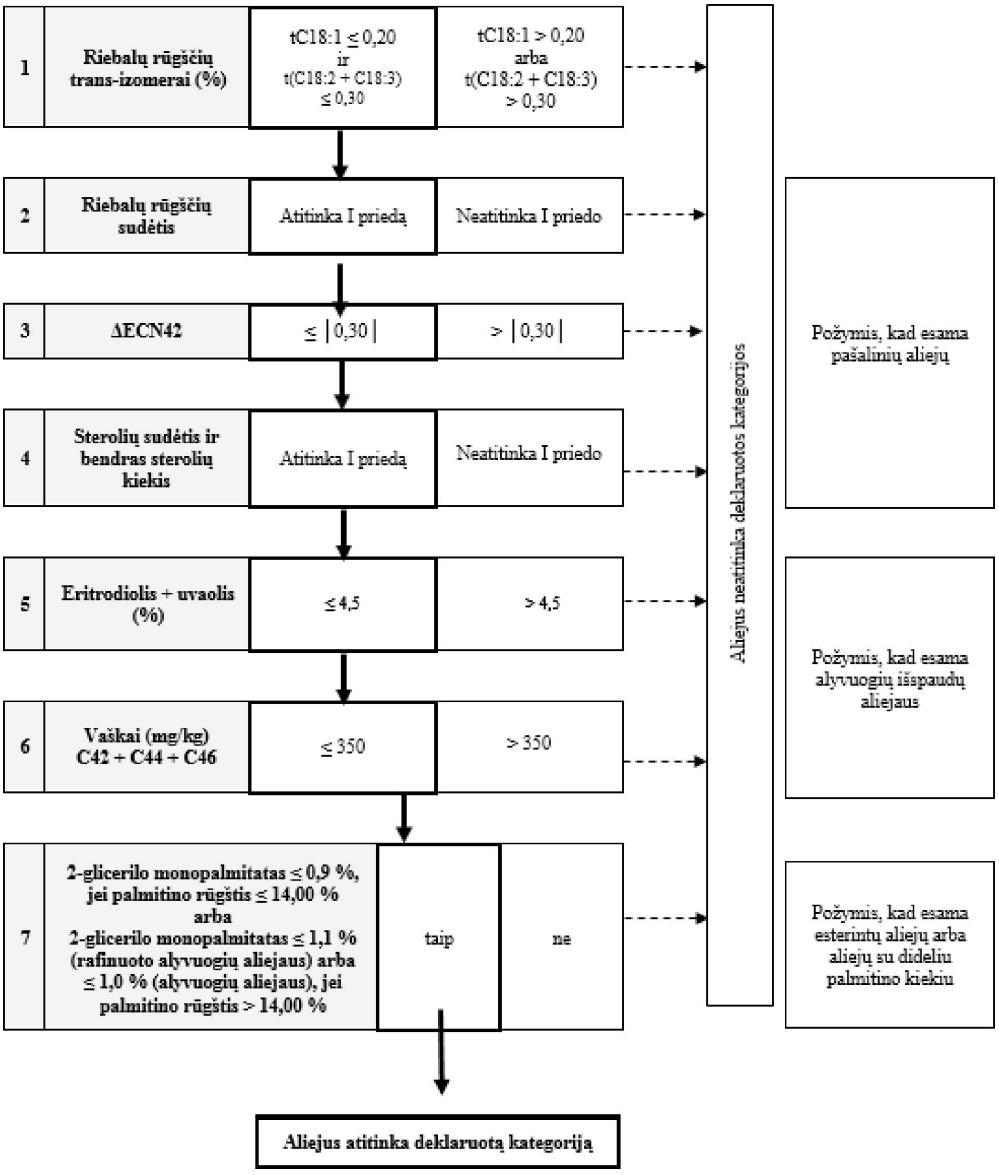
5 lentelė. Rafinuotas alyvuogių aliejus. Kokybės kriterijai



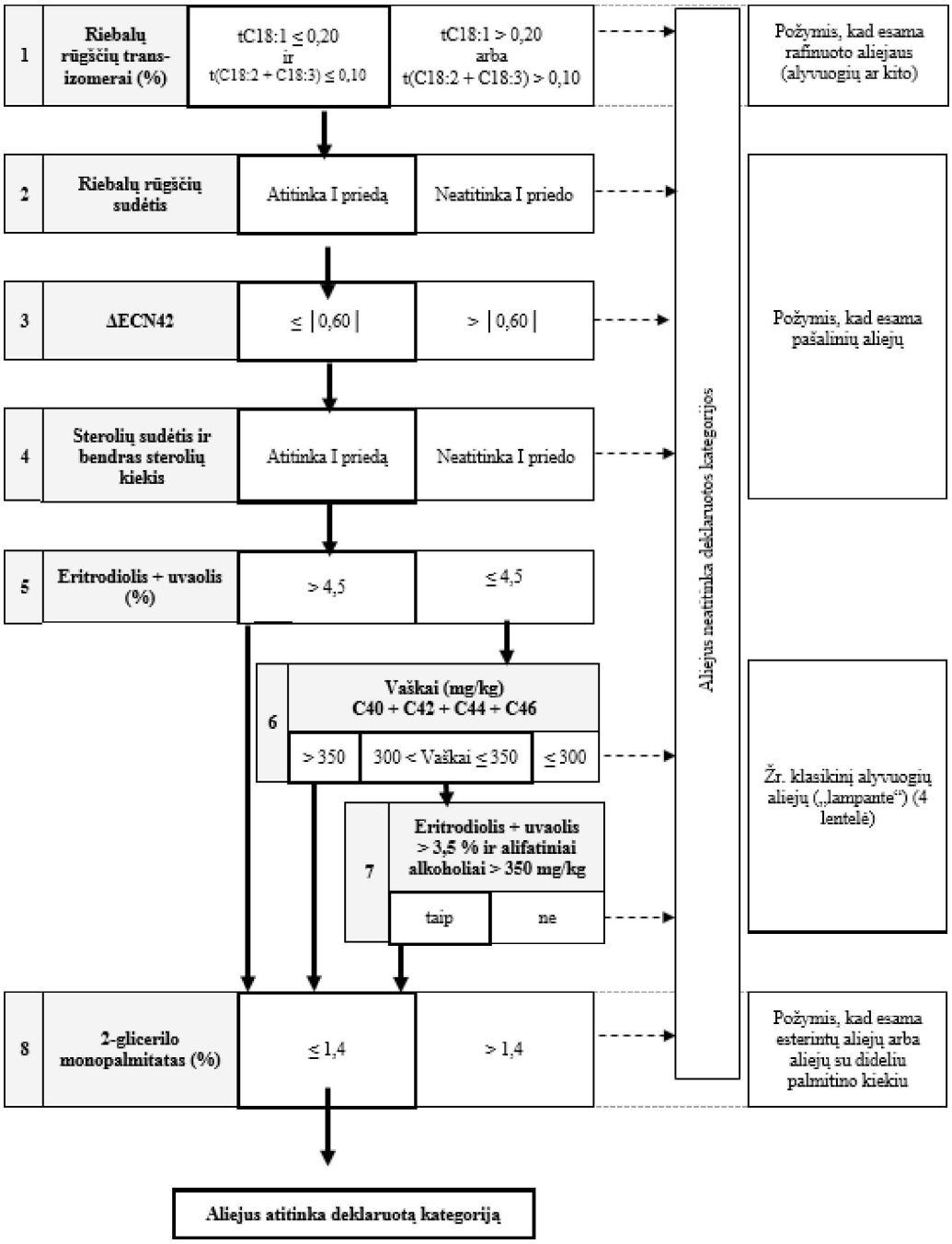
6 lentelė. Alyvuogių aliejus (sudarytas iš rafinuoto alyvuogių aliejaus ir gryno alyvuogių aliejaus). Kokybės kriterijai



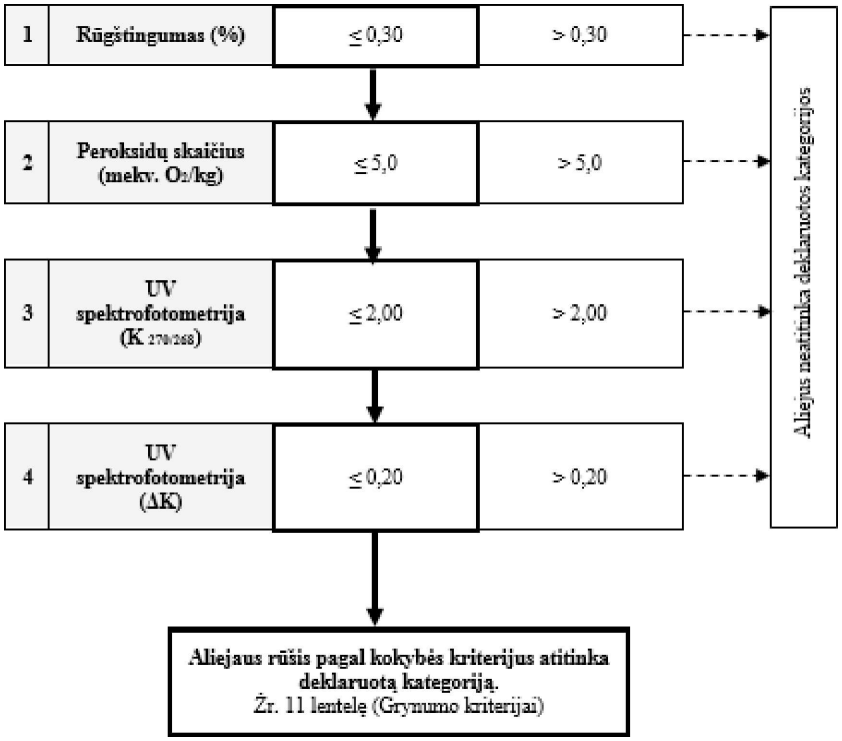
7 lentelė. Rafinuotas alyvuogių aliejus ir alyvuogių aliejus, sudarytas iš rafinuoto alyvuogių aliejaus ir gryno alyvuogių aliejaus. Grynumo kriterijai



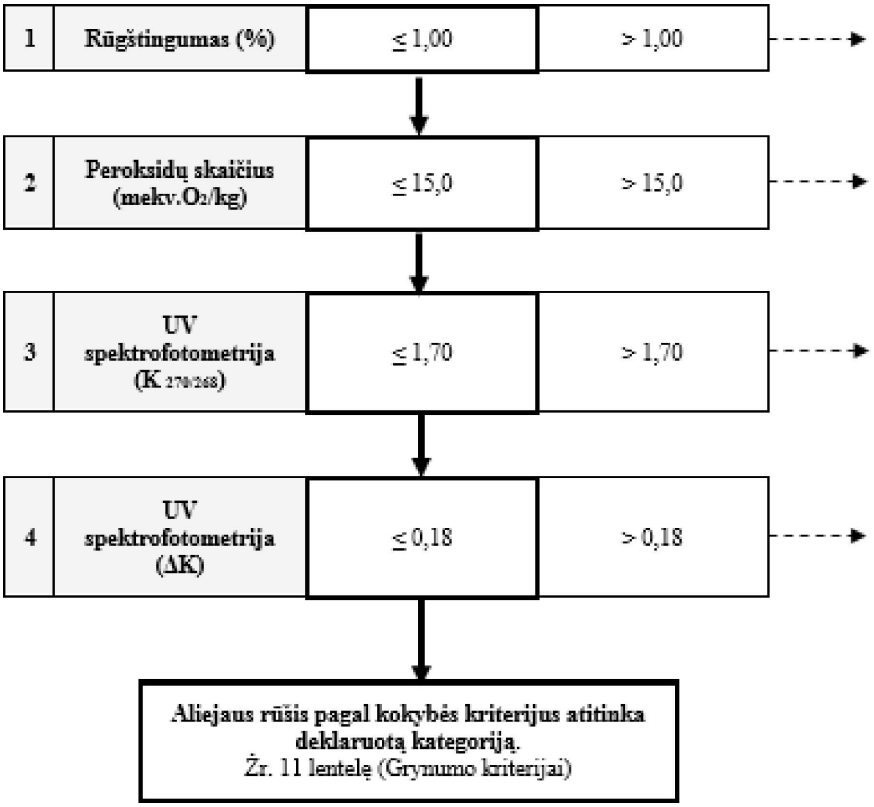
8 lentelė. Neapdorotas alyvuogių išspaudų aliejus. Grynumo kriterijai



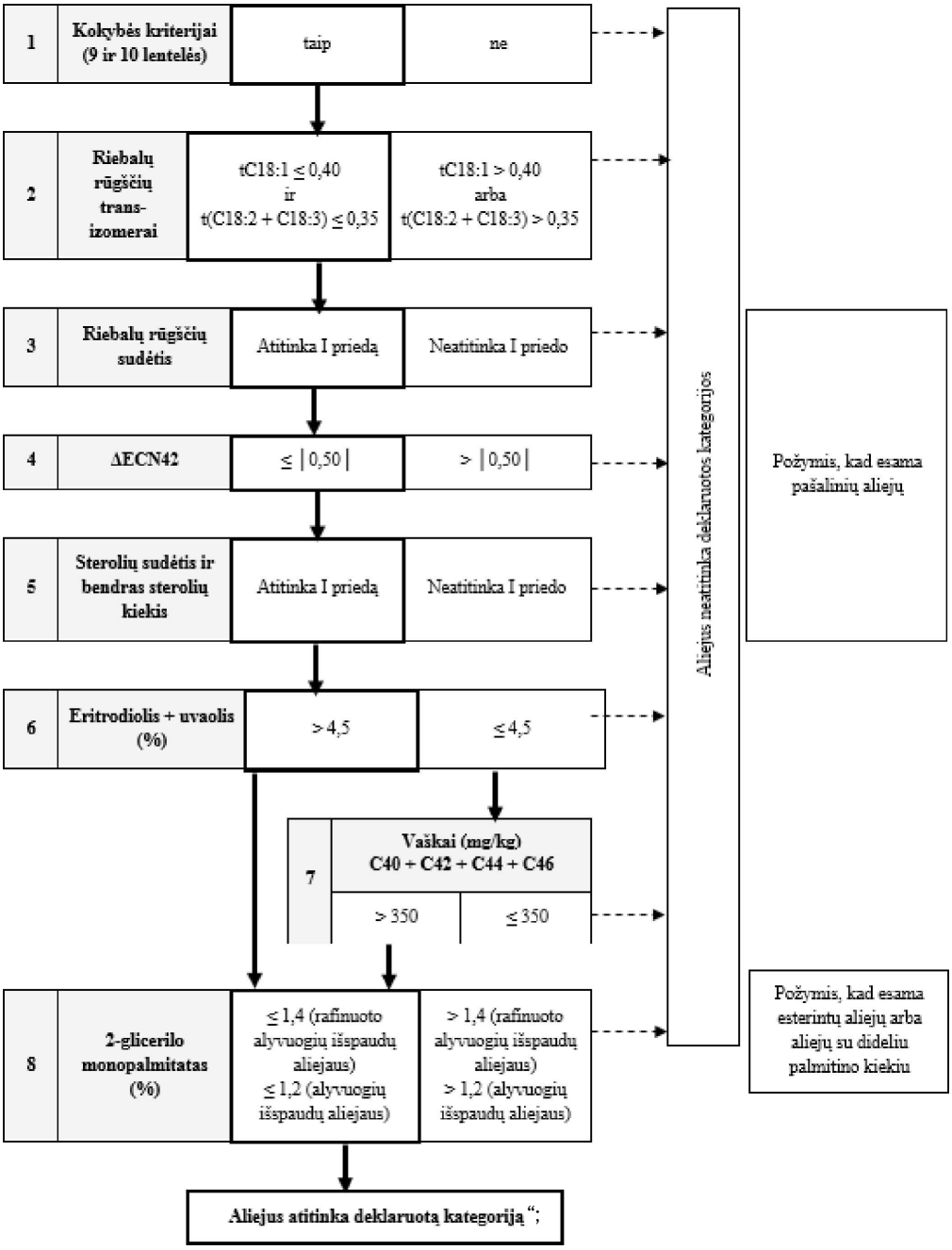
9 lentelė. Rafinuotas alyvuogių išspaudų aliejus. Kokybės kriterijai



10 lentelė. Alyvuogių išspaudų aliejus. Kokybės kriterijai



11 lentelė. Rafinuotas alyvuogių išspaudų aliejus ir alyvuogių išspaudų aliejus. Grynumo kriterijai



IV PRIEDAS

XII priedas iš dalies keičiamas taip:

1) 3.3 punktas pakeičiamas taip:

„3.3. **Neprivalomi ženklinimo terminai**

Gavęs prašymą, degustuotojų grupės vadovas gali patvirtinti, kad įvertinti aliejai atitinka apibrėžtis ir parametrų intervalus, pagal kuriuos jie, atsižvelgiant į požymių stiprumą ir juntamumą, apibūdinami tik toliau nurodytais terminais.

Teigiami požymiai (vaisių skonis, kartumas ir aitrumas) – pagal pojūčio stiprumą:

— *stiprus*, kai požymio mediana didesnė nei 6,0;

— *vidutinis*, kai požymio mediana yra nuo 3,0 iki 6,0;

— *silpnas*, kai požymio mediana mažesnė nei 3,0.

Vaisių požymis	Įvairūs aliejaus paprastai sukeliami uoslės pojūčiai, kurie priklauso nuo alyvuogių veislės ir kuriuos lemia aliejui naudotos sveikos ir šviežios alyvuogės, neturinčios vyraujančio nei žalių, nei sunokusių vaisių skonio. Pajuntamas iš karto ir (arba) giliai nosyje.
Žalių vaisių požymis	Įvairūs aliejaus paprastai sukeliami uoslės pojūčiai, kurie priklauso nuo alyvuogių veislės ir kuriuos lemia aliejui naudotos žalios, sveikos ir šviežios alyvuogės; juntamas žalių vaisių aromatas. Pajuntamas iš karto ir (arba) giliai nosyje.
Sunokusių vaisių požymis	Įvairūs aliejaus paprastai sukeliami uoslės pojūčiai, kurie priklauso nuo alyvuogių veislės ir kuriuos lemia aliejui naudotos sveikos ir šviežios alyvuogės; juntamas sunokusių vaisių aromatas. Pajuntamas iš karto ir (arba) giliai nosyje.
Subalansuotas aliejus	Aliejus, kuriam netrūksta uoslės, skonio ir lietimo pojūčių pusiausvyros (kurio kartumo mediana ir aitrumo mediana yra ne daugiau kaip dviem punktais didesnės nei vaisių požymio mediana).
Švelnus aliejus	Aliejus, kurio kartumo ir aitrumo medianos yra ne didesnės kaip 2,0.

Terminų sąrašas pagal pojūčio stiprumą:

Terminus galima vartoti pateikus organoleptinio tyrimo sertifikatą	Požymio mediana
Vaisių skonio	—
Sunokusių vaisių skonio	—
Žalių vaisių skonio	—
Lengvo vaisių skonio	≤ 3,0
Vidutinio vaisių skonio	Nuo 3,0 iki 6,0
Stipraus vaisių skonio	> 6,0
Lengvo sunokusių vaisių skonio	≤ 3,0
Vidutinio sunokusių vaisių skonio	Nuo 3,0 iki 6,0
Stipraus sunokusių vaisių skonio	> 6,0
Lengvo žalių vaisių skonio	≤ 3,0
Vidutinio žalių vaisių skonio	Nuo 3,0 iki 6,0
Stipraus žalių vaisių skonio	> 6,0

Terminus galima vartoti pateikus organoleptinio tyrimo sertifikatą	Požymio mediana
Lengvai kartus	≤ 3,0
Vidutiniškai kartus	Nuo 3,0 iki 6,0
Stipriai kartus	> 6,0
Lengvai aitrus	≤ 3,0
Vidutiniškai aitrus	Nuo 3,0 iki 6,0
Stipriai aitrus	> 6,0
Subalansuotas aliejus	Kartumo mediana ir aitrumo mediana yra ne daugiau kaip 2,0 punktais didesnės nei vaisių požymio mediana.
Švelnus aliejus	Kartumo mediana ir aitrumo mediana yra ne didesnės kaip 2,0.“;

2) 9.4 punktas pakeičiamas taip:

„9.4. **Aliejaus klasifikavimas**

Atsižvelgiant į trūkumų medianą ir vaisių požymio medianą, aliejus priskiriamas prie kurios nors iš toliau nurodytų kategorijų. Trūkumų mediana – stipriausiai pajusto trūkumo mediana. Trūkumų mediana ir vaisių požymio mediana išreiškiamos vienos dešimtosios tikslumu.

Aliejaus kategorija nustatoma lyginant trūkumų medianos ir vaisių požymio medianos vertes su toliau nustatytais etaloniniais intervalais. Šių intervalų ribos nustatytos atsižvelgiant į metodo paklaidas, todėl tos ribos laikomos absoliučiomis. Naudojant programinę įrangą skirstymą į kategorijas galima atvaizduoti statistikos duomenų lentelėje arba diagramoje.

a) ypač grynas alyvuogių aliejus: trūkumų mediana lygi 0,0, o vaisių požymio mediana didesnė nei 0,0;

b) grynas alyvuogių aliejus: trūkumų mediana didesnė nei 0,0, bet ne didesnė kaip 3,5, o vaisių požymio mediana didesnė nei 0,0;

c) klasikinis grynas alyvuogių aliejus („lampante“): trūkumų mediana didesnė nei 3,5 arba trūkumų mediana ne didesnė nei 3,5, o vaisių požymio mediana lygi 0,0.

1 pastaba. Jeigu kartumo ir (arba) aitrumo mediana yra didesnė nei 5,0, degustuotojų grupės vadovas tai pažymi aliejaus tyrimo sertifikate.

Jei aliejus vertinamas atitikčiai kontroliuoti, tyrimas atliekamas vieną kartą. Priešingų vertinimų atveju analizė atliekama du kartus – per skirtingas degustacijas. Dvigubos analizės rezultatai turi būti statistiškai homogeniški (žr. 9.5 punktą). Jei taip nėra, ėminys vėl analizuojamas du kartus. Klasifikavimo požymių medianos galutinė vertė apskaičiuojama remiantis abiejų medianų vidurkiu.“

V PRIEDAS

XVII priedas iš dalies keičiamas taip:

1) 5.1 punktas pakeičiamas taip:

„5.1. Heksanas arba alkanų mišinys, kurio virimo temperatūrų intervalas yra 65–70 °C, distiliuotas rektifikavimo kolonoje. Heksanas gali būti keičiamas izooktanu (chromatografijai tinkamu 2,2,4-trimetilpentanu), jei gaunamos panašaus tikslumo vertės. Gali būti tikrinamas likutis išgarinus 100 ml tirpiklio. Tirpikliai, kurių virimo temperatūra yra aukštesnė negu n-heksano, išgaruoja lėčiau. Tačiau dėl heksano toksiškumo jiems teikiama pirmenybė.“;

2) 6.3.3 punktas papildomas šiuo tekstu:

„10 pastaba. Jei stigmastadienų koncentracija viršija 4 mg/kg ir reikia atlikti kiekybinį vertinimą, turi būti taikomas Tarptautinės alyvuogių tarybos metodas „Rafinuotame aliejuje esančių stirenų nustatymas“.“

VI PRIEDAS

XVIII priedas iš dalies keičiamas taip:

1) 4.2.1 punktas pakeičiamas taip:

„4.2.1. Tinkamas chromatografijai petroleteris, virimo temperatūra 40–60 °C, arba heksanas. Heksanas gali būti keičiamas izooktanu (chromatografijai tinkamu 2,2,4-trimetilpentanu), jei gaunamos panašaus tikslumo vertės. Tirpikliai, kurių virimo temperatūra yra aukštesnė negu n-heksano, išgaruoja lėčiau. Tačiau dėl heksano toksiškumo jiems teikiama pirmenybė.“;

2) pridedamas 4.2.12 punktas:

„4.2.12. Tinkamas chromatografijai heptanas. Heptanas gali būti keičiamas izooktanu (chromatografijai tinkamu 2,2,4-trimetilpentanu).“

VII PRIEDAS

„XIX PRIEDAS

STEROLIŲ SUDĖTIES BEI KIEKIO IR ALKOHOLIO JUNGINIŲ NUSTATYMAS KAPILIARINĖS DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU

1. TIKSLAS

Šio metodo apraše apibūdinama alyvuogių aliejaus ir alyvuogių išspaudų aliejaus bei abiejų šių aliejų mišinių individualaus ir bendro alkoholio junginių kiekio nustatymo procedūra.

Alyvuogių aliejaus ir alyvuogių išspaudų aliejaus alkoholio junginius sudaro alifatiniai alkoholiai, steroliai ir triterpeno dialkoholiai.

2. PRINCIPAS

Aliejai, įdėjus α-cholestanolio ir 1-eikozanolio kaip vidinio etalono, muilinami kalio hidroksido etanoliniu tirpalu, o nemuilinama medžiaga ekstrahuojama etileteriu.

Skritingų alkoholio junginių frakcijos atskiriamos nuo nemuilinamosios medžiagos ant šarmu impregnuotos silikagelio plokštelės plonasluoksnės chromatografijos metodu (etaloninis metodas) arba efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC), naudojant silikagelio kolonėlę. Atskyrus silikagelį regeneruota frakcija paverčiama trimetilsilileteriais ir analizuojama kapiliarinės dujų chromatografijos metodu.

1 DALIS

NEMUILINAMOSIOS MEDŽIAGOS PARUOŠIMAS

1. DALYKAS

Šioje dalyje aprašomas nemuilinamosios medžiagos paruošimas ir ekstrahavimas. Ji apima nemuilinamosios medžiagos paruošimą ir ekstrahavimą iš alyvuogių ir alyvuogių išspaudų aliejaus.

2. PRINCIPAS

Tiriamoji dalis muilinama su kalio hidroksido tirpalu etanolyje, verdant su grįžtamuoju kondensatoriumi. Nemuilinamoji medžiaga ekstrahuojama dietileteriu.

3. PRIETAISAI

Įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:

3.1. 250 ml apvaliadugnė kolba, prie kurios pritaisytas grįžtamasis kondensatorius su matinio stiklo šlifais.

3.2. 500 ml dalijamasis piltuvas.

3.3. 250 ml kolbos.

3.4. 100 µl ir 500 µl mikrošvirkštai.

3.5. G3 akytumo cilindro formos filtras (15–40 µm akytumas), maždaug 2 cm skersmens ir 5 cm aukščio, tinkamas vakuuminiam filtravimui, su vidiniu matinio stiklo šlifu.

3.6. 50 ml talpos kūgio formos kolba su išoriniu matinio stiklo šlifu filtrui (3.5) prijungti.

3.7. 10 ml talpos mėgintuvėlis su kūginiu dugnu ir sandariu stiklo kamščiu.

3.8. Kalcio dichlorido eksikatorius.

4. REAGENTAI

4.1. Kalio hidroksidas, mažiausias titras – 85 %.

4.2. Kalio hidroksido tirpalas etanolyje, maždaug 2 M.

130 g kalio hidroksido (4.1) ištirpinama aušinant 200 ml distiliuoto vandens ir paskui praskiedžiama etanoliu (4.7) iki 1 litro. Tirpalas turi būti laikomas gerai užkimštuose tamsaus stiklo buteliuose ir saugomas ne ilgiau kaip dvi dienas.

4.3. Analizei tinkamos kokybės etileteris.

4.4. Analizei tinkamos kokybės bevandenis natrio sulfatas.

4.5. Chromatografijai tinkamos kokybės acetonas.

4.6. Chromatografijai tinkamos kokybės etileteris.

4.7. Analizei tinkamos kokybės etanolis.

4.8. Analizei tinkamos kokybės etilacetatas.

4.9. Vidinio etalono α-cholestanolis, didesnio nei 99 % grynumo (grynumas turi būti patikrintas dujų chromatografijos analizės metodu).

4.10. α-cholestanolio vidinio etalono tirpalas, 0,2 % tirpalas (m/V) etilacetate (4.8).

4.11. Fenolftaleino tirpalas, 10 g/l etanolyje (4.7).

4.12. 0,1 % (m/v) 1-eikozanolio tirpalas etilacetate (vidinis etalonas).

5. PROCEDŪRA

Į 250 ml talpos kolbą (3.1) 500 µl mikrošvirkštu (3.4) įšvirkščiamas toks α-cholestanolio vidinio etalono tirpalo (4.10) ir 1-eikozanolio (4.12) kiekis, kuriame cholestanolio ir eikozanolio kiekis atitiktų maždaug 10 % mėginio sterolių ir alkoholio kiekio. Pavyzdžiui, į 5 g alyvuogių aliejaus mėginį įpilama 500 µl α-cholestanolio tirpalo (4.10) ir 250 µl 1-eikozanolio tirpalo (4.12). Į alyvų išspaudų aliejų įpilama po 1 500 µl α-cholestanolio tirpalo (4.10) ir 250 µl 1-eikozanolio tirpalo (4.12). Tirpalas naudojant silpną azoto srovę šilto vandens vonelėje išgarinamas iki sauso likučio. Kolba atvėsinama, į tą pačią kolbą pasveriama 5 ± 0,01 g sauso filtruoto mėginio.

1 pastaba. Gyvulinės kilmės arba augaliniai aliejai ir riebalai, kuriuose yra nemaži kiekiai cholesterolio, chromatogramoje gali turėti smailę, kurios sulaikymo trukmė identiška cholestanolio. Tokiu atveju sterolių frakcija turi būti analizuojama du kartus – su vidiniu etalonu ir be jo.

Į kolbą įpilama 50 ml 2 M kalio hidroksido tirpalo etanolyje (4.2) ir įdedama šiek tiek pemzos, prijungiamas grįžtamasis kondensatorius ir kolba šildoma iki nestipraus virimo, kol įvyksta muilinimas (tirpalas pasidaro skaidrus). Šildoma dar 20 minučių, paskui per kondensatoriaus viršų įpilama 50 ml distiliuoto vandens, kondensatorius atjungiamas ir kolba ataušinama iki maždaug 30 °C.

Kolbos turinys naudojant kelias distiliuoto vandens porcijas (50 ml) kiekybiškai supilamas į 500 ml dalijamąjį piltuvą (3.2). Įpilama maždaug 80 ml etileterio (4.6), turinys stipriai plakamas maždaug 60 sekundžių periodiškai sumažinant slėgį apverčiant dalijamąjį piltuvą ir atidarant čiaupą. Kolba paliekama stovėti, kol turinys visiškai išsisluoksniuoja į dvi fazes (2 pastaba). Paskui kuo didesnis muilo tirpalo kiekis išleidžiamas į antrąjį dalijamąjį piltuvą. Vandens ir alkoholio fazė tuo pačiu būdu ekstrahuojama dar du kartus, kiekvieną kartą sunaudojant 60–70 ml etileterio (4.6).

2 pastaba. Bet kokia susidariusi emulsija gali būti panaikinta įpilant nedidelį kiekį etanolio (4.7).

Trys eteriniai ekstraktai supilami į vieną dalijamąjį piltuvą, kuriame yra 50 ml vandens. Mišinys plaunamas vandeniu (50 ml), kol plovimo vanduo, įlašinus fenolftaleino tirpalo (4.11) lašą, nebenusidažo rožine spalva. Atskyrus plovimo vandenis, ekstraktas per bevandenį natrio sulfatą (4.4) filtruojamas į prieš tai pasvertą 250 ml kolbą, piltuvą ir filtrą nuplaunant nedideliu kiekiu etileterio (4.6).

Tirpiklis distiliuojant vakuume išgarinamas sukamuoju garintuvu 30 °C temperatūroje. Įpilama 5 ml acetono (4.5) ir lakus tirpiklis visiškai pašalinamas silpnoje azoto srovėje. Likutis 15 minučių džiovinamas džiovinimo spintoje 103 ± 2 °C temperatūroje. Paskui likutis ataušinamas eksikatoriuose ir pasveriamas 0,1 mg tikslumu.

2 DALIS

ALKOHOLIO JUNGINIŲ FRAKCIJŲ ATSKYRIMAS

1. DALYKAS

Nemuilinamoji medžiaga, paruošta kaip nurodytas 1 dalyje, frakcionuojama į skirtingus alkoholio junginius, alifatinius alkoholius, sterolius ir triterpeno dialkoholius (eritrodiolį ir uvaolį).

2. PRINCIPAS

Nemuilinamoji medžiaga gali būti frakcionuojama bazinės plonasluoksnės chromatografijos metodu (etaloninis metodas), o išryškėjusios atitinkamos juostelės nugremžiamos ir ekstrahuojamos. Alternatyvus atskyrimo metodas – naudoti efektyviąją skysčių chromatografiją (HPLC) su silikagelio kolonėle ir UV detektoriumi ir surinkti skirtingas frakcijas. Alifatiniai ir triterpeno alkoholiai, taip pat sterolis ir triterpeno dialkoholiai izoliuojami kartu.

3. PRIETAISAI

Įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:

3.1. Visa įranga plonasluoksnei chromatografinei analizei atlikti naudojant 20 × 20 cm matmenų stiklines plokšteles.

3.2. Ultravioletinė 366 arba 254 nm ilgio šviesos bangų lempa.

3.3. 100 µl ir 500 µl mikrošvirkštai.

3.4. G3 akytumo (15–40 µm akytumo) cilindro formos filtras, maždaug 2 cm skersmens ir 5 cm aukščio, tinkamas vakuuminiam filtravimui, su vidiniu matinio stiklo šlifu.

3.5. 50 ml talpos kūgio formos kolba su išoriniu matinio stiklo šlifu filtrui (3.4) prijungti.

3.6. 10 ml talpos mėgintuvėlis su kūginiu dugnu ir sandariu stiklo kamščiu.

3.7. Kalcio dichlorido eksikatorius.

3.8. Efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) sistema, kurią sudaro:

3.8.1. Dvinaris siurblys.

3.8.2. Rankinis arba automatinis injektorius su 200 µL injekcijos kilpa.

3.8.3. Linijinis nudujinimo įtaisas.

3.8.4. UV-Vis arba IR detektorius.

3.9. HPLC kolonėlė (vidinis skersmuo – 25 cm x 4 mm) su silikageliu 60 (dalelių dydis – 5 µm).

3.10. 0,45 µm švirkšto filtras.

3.11. 25 ml kūginė kolba.

4. REAGENTAI

4.1. Kalio hidroksidas, mažiausias titras – 85 %.

4.2. Kalio hidroksido tirpalas etanolyje, maždaug 2 M.

130 g kalio hidroksido (4.1) ištirpinama aušinant 200 ml distiliuoto vandens ir paskui praskiedžiama etanoliu (4.9) iki 1 litro. Tirpalas turi būti laikomas gerai užkimštuose tamsaus stiklo buteliuose ir saugomas ne ilgiau kaip dvi dienas.

4.3. Analizei tinkamos kokybės etileteris.

4.4. Kalio hidroksido tirpalas etanolyje, maždaug 0,2 M.

13 g kalio hidroksido (4.1) ištirpinama 20 ml distiliuoto vandens ir praskiedžiama etanoliu (4.9) iki 1 litro.

4.5. Fluorescencijos indikatoriumi neužteršto silikagelio 0,25 mm sluoksniu dengtos stiklinės 20x20 plokštelės (galima įsigyti paruoštų naudoti plokštelių).

4.6. Chromatografijai tinkamos kokybės acetonas.

4.7. Chromatografijai tinkamos kokybės n-heksanas.

4.8. Chromatografijai tinkamos kokybės etileteris.

4.9. Analizei tinkamos kokybės etanolis.

4.10. Analizei tinkamos kokybės etilacetatas.

4.11. Plonasluoksnės chromatografijos etaloninis tirpalas: cholesterolis, fitosteroliai, alkoholiai ir eritrodiolio 5 % tirpalas etilacetate (4.10).

4.12. 0,2 % 2,7-dichlorfluoresceino tirpalas etanolyje. Jis truputį pašarminamas, įlašinant kelis lašus 2 M kalio hidroksido tirpalo alkoholyje (4.2).

4.13. n-heksano (4.7) ir etileterio (4.8) mišinys, kurio tūrinis procentas 65:35.

4.14. Judančioji HPLC fazė: n-heksano (4.7) ir etileterio (4.8) mišinys, kurio tūrinis procentas 1:1.

5. ETALONINIS METODAS ALKOHOLIO JUNGINIŲ ATSKYRIMAS BAZINĖS PLONASLUOKSNĖS CHROMATOGRAFIJOS (TLC) PLOKŠTELE

Ruošiamos bazinės plonasluoksnės chromatografijos plokštelės. Silikagelio plokštelės (4.5) 10 sekundžių maždaug 4 cm panardinamos arba įmerkiamos į 0,2 M kalio hidroksido tirpalą etanolyje (4.4), paskui paliekamos dvi valandas džiūti traukos spintoje ir vienai valandai įdedamos į 100 °C temperatūros džiovinimo spintą.

Plokštelės išimamos iš džiovinimo spintos ir laikomos eksikatoriuje su kalcio chloridu (3.7), kol jų prireikia (taip apdorotos plokštelės turi būti panaudotos per 15 dienų).

Į ryškinimo indą maždaug 1 cm storio sluoksniu įpilama heksano ir etileterio mišinio (4.13) (3 pastaba). Indas uždaromas ir paliekamas vėsioje vietoje ne trumpiau kaip pusei valandos pusiausvyrai tarp garų ir skysčio nusistovėti. Ant vidinių indo sienelių gali būti uždedamos filtro popieriaus juostelės. Taip maždaug trečdaliu sutrumpinama ryškinimo trukmė, o komponentų eliuavimas atliekamas vienodžiau ir pastoviau.

3 pastaba. Ryškinimo tirpalas turėtų būti pakeičiamas kiekvienam tyrimui, siekiant užtikrinti visiškai pakartojamas eliuavimo sąlygas. Kaip alternatyvus tirpiklis gali būti naudojamas n-heksano ir etileterio mišinys, kurio tūrinis procentas 50:50.

Imama maždaug 5 % nemuilinamos medžiagos tirpalo etilacetate (4.10), paruošto kaip nurodyta 1 dalyje, ir 0,3 ml šio tirpalo 100 µl talpos mikrošvirkštu (3.3) vienoda siaura juostele užlašinama ant apatinės chromatografinės plokštelės (4.5) dalies (2 cm nuo apačios). Vienoje linijoje su šia juostele užlašinama 2–3 µl medžiagos etaloninio tirpalo (4.11), kad sterolio, triterpeno dialkoholių ir alkoholių juostas būtų galima identifikuoti užbaigus ryškinimą.

Plokštelė dedama į ryškinimo indą (3.1). Turėtų būti palaikoma 15–20 °C aplinkos temperatūra (4 pastaba). Indas iš karto uždengiamas ir plaunama, kol tirpiklio frontas atsiduria maždaug 1 cm atstumu nuo plokštelės viršutinio krašto. Plokštelė išimama iš ryškinimo indo ir tirpiklis išgarinamas karšto oro srovėje arba plokštelė trumpam paliekama traukos spintoje.

4 pastaba. Aukštesnė temperatūra gali pasunkinti atskyrimą.

Plokštelė plonai ir vienodai apipurškiama 2,7-dichlorfluoresceino tirpalu (4.12) ir paliekama išdžiūti. Žiūrint į plokštelę su ultravioletine lempa (3.2), sterolių, triterpeno dialkoholių ir alkoholių juostelės gali būti atpažintos pagal buvimą viename lygyje su etaloninio tirpalo (4.11) dėmėmis. Juostelių ribos pagal fluorescuojančius kraštus pažymimos juodu pieštuku (žr. 1 pav., kuriame vaizduojama plonasluoksnės chromatografijos plokštelė).

Silikagelis pažymėtame plote nugrandomas metaline mentele. Gerai susmulkinta medžiaga nuo plokštelės supilama į filtrą (3.4). Įpilama 10 ml karšto etilacetato (4.10), gerai sumaišoma metaline mentele ir filtruojama (jei reikia, vakuume) į kūgio formos kolbą (3.5), prijungtą prie filtro.

Likutis kolboje tris kartus plaunamas etileteriu (4.3) (maždaug po 10 ml kiekvieną kartą), filtruojant į tą pačią prie filtro prijungtą kolbą; filtratas nugarinamas iki maždaug 4–5 ml tūrio, likęs tirpalas supilamas į 10 ml talpos mėgintuvėlį (3.6), kuris prieš tai pasveriamas; mėgintuvėlio turinys džiovinamas nestipriai kaitinant nedidelėje azoto srovėje, iš naujo tirpinamas keliuose acetono (4.6) lašuose ir vėl džiovinamas. Likutį mėgintuvėlyje turi sudaryti sterolių ir triterpeno dialkoholių arba alokoholių ir triterpeno alkoholių frakcijos.

6. ALKOHOLIO FRAKCIJOS ATSKYRIMAS HPLC METODU

Nemuilinamoji medžiaga, gauta kaip aprašyta 1 dalyje, ištirpinama 3 ml judančiosios fazės (4.14), tirpalas filtruojamas švirkšto filtru (3.10) ir atidedamas.

Į HPLC sistemą (3.8) įšvirkščiama 200 µl filtruoto nemuilinamosios medžiagos tirpalo.

HPLC atskyrimas atliekamas 0,8 ml/min. srautu, per pirmąsias 5 min. gauta dalis išpilama, o vėlesnė surenkama į 25 ml kūgines kolbas (3.11): 5–10 min. – alifatinių ir triterpeno alkoholių, 11–25 min. – sterolių ir eritrodiolio bei uvaolio (5 pastaba).

Atskyrimą galima stebėti UV detektoriumi, esant 210 nm bangos ilgiui, arba lūžio rodiklio detektoriumi (žr. 6 pav.).

Frakcijos išgarinamos iki sauso likučio ir paruošiamos chromatografinei analizei.

5 pastaba. Kruopščiai kontroliuoti HPLC siurblio slėgį, nes slėgis dėl etileterio gali padidėti, todėl reikia reguliuoti srautą, kad slėgis būtų kontroliuojamas.

3 DALIS

ALKOHOLIO JUNGINIŲ FRAKCIJŲ DUJŲ CHROMATOGRAFINĖ ANALIZĖ

1. DALYKAS

Šioje dalyje aprašyti bendri nurodymai, kaip taikyti kapiliarinės dujų chromatografijos metodą, siekiant nustatyti alkoholio junginių, atskirtų taikant šio metodo 2 dalyje nurodytą procedūrą, kokybinę ir kiekybinę sudėtį.

2. PRINCIPAS

Frakcijos, surinktos iš nemuilinamosios medžiagos naudojant TLC arba HPLC, paverčiamos trimetilsililеteriais ir analizuojamos kapiliarinės dujų chromatografijos metodu su dozuojamojo mėginio injektoriumi ir liepsnos jonizacijos detektoriumi.

3. PRIETAISAI

Įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:

3.1. 10 ml talpos mėgintuvėlis su kūginiu dugnu ir sandariu stiklo kamščiu.

3.2. Darbui su kapiliarine kolonėle tinkamas dujų chromatografas su dozuojamojo mėginio įpurškimo sistema, kurį sudaro:

3.2.1. termostatuojama kamera norimai temperatūrai kolonėlėse palaikyti ± 1 °C tikslumu;

3.2.2. reguliuojamos temperatūros įpurškimo įrenginys su polisiloksanu dengtu garinimo elementu ir dozavimo sistema;

3.2.3. liepsnos jonizacinis detektorius (FID);

3.2.4. duomenų rinkimo sistema, tinkama naudoti su FID detektoriumi (3.10.3) ir pritaikyta rankiniam integravimui.

3.3. Lydyto kvarco 20–30 m ilgio kapiliarinė kolonėlė, kurios vidinis skersmuo 0,25–0,32 mm, padengta vienodo 0,10–0,30 µm storio 5 % difenilo – 95 % dimetilpolisiloksano (SE-52 arba SE-54 nejudančiosios fazės arba ją atitinkančia plėvele) sluoksniu.

3.4. 10 µl talpos mikrošvirkštas dujų chromatografijai su kietinta adata, tinkama dozuojamajam įpurškimui.

4. REAGENTAI

4.1. Chromatografijai tinkamos kokybės bevandenis piridinas.

4.2. Analizei tinkamos kokybės heksametildisilazanas.

4.3. Analizei tinkamos kokybės trimetilchlorsilanas.

4.4. Sterolių trimetilsililеterių mėginio tirpalai. Ruošiami prieš pat juos naudojant iš sterolių ir eritrodiolio, gauto iš šių medžiagų turinčių aliejų.

4.5. Etaloniniai trimetilsililеterių ir C20 – C28 alifatinių alkoholių tirpalai. Jie gali būti paruošiami iš grynųjų alkoholių mišinių tuo metu, kai juos reikia naudoti.

4.6. Nešančiosios dujos: vandenilis arba helis, dujų chromatografijai tinkamo grynumo.

4.7. Pagalbinės dujos: vandenilis, helis, azotas ir oras, dujų chromatografijai tinkamo grynumo.

4.8. Sililinimo reagentas, kurį sudaro piridino, heksametildisilazano ir trimetilchlorsilano mišinys, kurio tūrinis procentas 9:3:1.

4.9. Chromatografijai tinkamos kokybės n-heksanas.

5. TRIMETILSILILETERIŲ RUOŠIMAS

Į mėgintuvėlį (3.1) su alkoholio junginio frakcija, vengiant bet kokio drėgmės patekimo (7 pastaba), įpilama sililinimo reagento (4.8) (6 pastaba), kurio imama po 50 μl vienam alkoholio junginio miligramui.

6 pastaba. Galima pirkti paruoštų naudoti tirpalų. Be to, galima pirkti ir kitų sililinimo reagentų, pvz., N,O-bi (trimetilsilil)trifluoracetamido + 1 % trimetilchlorsilano mišinį, kuris turi būti praskiestas tokio pat tūrio bevandeniu piridinu. Piridiną galima pakeisti tokiu pat acetonitrilo kiekiu.

7 pastaba. Nedidelė opalescencija yra įprastas reiškinys ir nesukelia jokių anomalijų. Baltų dribsnių susidarymas ar rožinė spalva yra drėgmės patekimo arba reagento sugedimo požymiai. Taip nutikus tyrimas turi būti pakartotas (tik jei naudojamas heksametildisilazano ir trimetilchlorsilano mišinys).

Mėgintuvėlis (3.1) užkemšamas ir atsargiai kratomas (neapverčiant), kol junginiai visiškai ištirpsta. Po to jis bent 15 minučių paliekamas stovėti aplinkos temperatūroje ir paskui kelias minutes centrifuguojamas. Skaidrus tirpalas paruoštas dujų chromatografinei analizei.

6. DUJŲ CHROMATOGRAFINĖ ANALIZĖ

6.1. Parengiamieji darbai ir kapiliarinės kolonėlės kondicionavimas

Kolonėlė (3.3) prijungiama prie dujų chromatografo, kolonėlės įėjimą sujungiant su dozuojamojo mėginio injektoriumi, o išėjimą – su detektoriumi.

Atliekamas bendras dujų chromatografo patikrinimas (nutekėjimai dujų sistemoje, detektoriaus, dozavimo sistemos ir savirašio veikimas ir kt.).

Jei kolonėlė naudojama pirmą kartą, rekomenduojama ją kondicionuoti: per kolonėlę paleidžiama nestipri dujų srovė, paskui įjungiamas dujų chromatografas ir pradedamas laipsniškas kaitinimas, kol temperatūra pakyla bent 20 °C aukščiau, nei naudojama darbe (8 pastaba). Šioje temperatūroje kolonėlė laikoma ne mažiau kaip dvi valandas, vėliau visas įrenginys nustatomas darbo režimu (reguliuojamas dujų srautas ir dozavimas, uždegama ugnis, prijungiama skaičiavimo sistema, reguliuojama kolonėlės, detektoriaus ir injektoriaus temperatūra ir t. t.) ir užrašomas signalas bent du kartus didesniu jautrumu, nei bus naudojamas analizei atlikti. Pagrindo linija turi būti brėžiama tiesi, be jokių smailių ir dreifo požymių. Neigiamas tiesinis nuokrypis rodo, kad nesandarūs kolonėlės sujungimai; teigiamas nuokrypis – kad kolonėlė nepakankamai kondicionuota.

8 pastaba. Kondicionavimo temperatūra visuomet turi būti bent 20 °C mažesnė, nei naudojamai nejudančiajai fazei nustatyta didžiausia temperatūra.

6.2. Veikimo sąlygos

Optimizuoti temperatūros programą ir nešančiųjų dujų srautą, kad būtų gautos chromatogramos, panašios į pavaizduotąsias 3–6 paveikslėliuose.

Patikrinti šie parametrai ir nustatyta, kad jie naudingi:

6.2.1. Alifatiniai alkoholiai

Džiovinimo spintos programa	180 °C (8 min.) → 260 °C (po 5 °C per minutę) → 260 °C (15 min.)
Injektoriaus temperatūra	280 °C
Detektoriaus temperatūra	290 °C
Nešančiųjų dujų linijinis greitis	helio – 20–35 cm/s; vandenilio – 30–50 cm/s
Padalijimo santykis	nuo 1:50 iki 1:100
Įšvirkščiamas tūris	0,5–1 µl TMSE tirpalo

6.2.2. Sterolis ir triterpeno dialkoholiai

Džiovinimo spintos programa	260 ± 5 °C, izoterminė
Injektoriaus temperatūra	280–300 °C
Detektoriaus temperatūra	280–300 °C
Nešančiųjų dujų linijinis greitis	helio – 20–35 cm/s; vandenilio – 30–50 cm/s
Padalijimo santykis	nuo 1:50 iki 1:100
Įšvirkščiamas tūris	0,5–1 µl TMSE tirpalo

Šios sąlygos gali būti keičiamos pagal kolonėlės ir dujų chromatografo savybes, kad būtų gautos chromatogramos, atitinkančios tokius reikalavimus:

— Alkoholio C26 sulaikymo trukmė turi būti 18 ± 5 minutės.

— Alkoholio C22 smailės aukštis, jei tiriamas alyvuogių aliejus, turi sudaryti 80 ± 20 %, o jei tiriamas alyvuogių išspaudų aliejus – 40 ± 20 % chromatogramos visos skalės aukščio.

— ß-sitosterolio smailės sulaikymo trukmė turėtų būti 20 ± 5 minutės.

— Kampesterolio smailės aukštis turėtų būti: alyvuogių aliejaus (vidutinis kiekis 3 %) – 20 ± 5 % visos skalės aukščio;

— Visi esantys steroliai turi būti atskirti. Be to, jų smailės turi būti visiškai atsiskyrusios, t. y. smailės trajektorija turi sugrįžti iki pagrindo linijos, kol prasideda kilimas atsiradus naujai smailei. Tačiau nevisiškas atsiskyrimas leidžiamas, jei smailės su santykine sulaikymo trukme 1,02 plotas (sitostanolis) gali būti apskaičiuotas naudojant statmenį.

6.3. Analizė

10 µl talpos mikrošvirkštu (3.4) įsiurbiama 1 µl heksano, paskui įtraukiama 0,5 µl oro ir 0,5–1 µl mėginio tirpalo. Mikrošvirkšto stūmoklis pastumiamas aukštyn, kad adata ištuštėtų. Adata įkišama per injektoriaus membraną ir po vienos dviejų sekundžių tirpalas greitai įšvirkščiamas, paskui po kokių penkių sekundžių adata lėtai ištraukiama. Taip pat gali būti naudojamas automatinis injektorius.

Užrašymas atliekamas, kol bus visiškai išplauti esančių atitinkamų alkoholio junginių TMSE. Pagrindinė linija turi toliau atitikti atitinkamų veikimo sąlygų reikalavimus (6.2.1 arba 6.2.2).

6.4. Smailių identifikavimas

Atskiros smailės identifikuojamos pagal sulaikymo trukmes ir lyginant su alifatinių ir triterpeno alkoholių arba sterolių ir triterpeno dialkoholių TMSE mišiniu, analizuojamu tokiomis pat sąlygomis. Alifatinių ir triterpeno alkoholių frakcijos chromatograma pavaizduota 3 paveiksle, o atitinkamos sterolių ir triterpeno dialkoholių chromatogramos pavaizduotos 2 paveiksle.

Alifatiniai alkoholiai išplaunami šia eilės tvarka: C20-olis (I.S.), C22-olis, C23-olis, C24-olis, C25-olis, C26-olis, C27-olis ir C28-olis.

Steroliai ir triterpeno dialkoholiai išplaunami tokia eilės tvarka: cholesterolis, brasikasterolis, ergosterolis, 24-metilencholesterolis, kampesterolis, kampestanolis, stigmasterolis, Δ7-kampesterolis, Δ5,23-stigmastadienolis, klerosterolis, β-sitosterolis, sitostanolis, Δ5-avenasterolis, Δ5,24-stigmastadienolis, Δ7-stigmastenolis, Δ7-avenasterolis, eritrodiolis ir uvaolis.

6.5. Kiekybinis vertinimas

1-eikozanolio ir C22, C24, C26 bei C28 alifatinių alkoholių smailių plotai apskaičiuojami duomenų rinkimo sistemomis. 1-eikozanolio atsako koeficientas turėtų būti laikomas lygiu 1.

Naudojant skaičiavimo sistemą apskaičiuojami α-cholestanolio ir sterolių bei triterpeno dialkoholių smailių plotai. Į 1 lentelėje nenurodytų junginių smailes neatsižvelgiama (ergosterolio smailės plotas neturi būti skaičiuojamas). α-cholestanolio atsako koeficientas turėtų būti laikomas lygiu 1.

Kiekvieno atskiro alkoholio junginio koncentracija, skaičiuojant miligramais 1 kg riebalinės medžiagos, nustatoma pagal tokią formulę:

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

čia:

A_x = x alkoholio junginio smailės plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais.

A_s = 1-eikozanolio/α-cholestanolio smailės plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais.

m_s = įdėto 1-eikozanolio/α-cholestanolio masė miligramais.

m = nustatymui paimto mėginio masė gramais.

7. REZULTATŲ PATEIKIMAS

Užrašoma atskirų alifatinių alkoholių ir triterpeno alkoholių koncentracija miligramais 1 kg riebalinės medžiagos ir jų suma (bendras alifatinių alkoholių kiekis). Bendras kiekis yra C22, C24, C26 ir C28 suma.

Kiekvieno atskiro alkoholio junginio sudėtis turėtų būti nurodoma vienos dešimtosios tikslumu.

Bendra sterolio koncentracija turėtų būti išreiškiama nenurodant jokių ženklų po kablelio.

Kiekvieno atskiro sterolio procentinė dalis apskaičiuojama pagal atitinkamo sterolio smailės ploto ir viso sterolių smailių ploto sumos santykį:

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

čia:

A_x = x sterolio smailės plotas.

ΣA = visas sterolių smailių plotas.

Tariamasis β-sitosterolis: Δ5,23-stigmastadienolis + klerosterolis + β-sitosterolis + sitostanolis + Δ5-avenasterolis + Δ5,24-stigmastadienolis.

Eritrodiolio ir uvaolio procentinė dalis apskaičiuojama taip:

$$Eritrodiolis + \ uvaolis = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

čia:

A_{Er} = eritrodiolio plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais.

A_{Uv} = uvaolio plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais.

Σ_{AT} = bendras sterolio + eritrodiolio + uvaolio plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais.

Apskaičiuojama ne tik atskirų sterolių ir triterpeno dialkoholių procentinė dalis ir bendra sterolių koncentracija. Naudojant toliau pateiktą formulę apskaičiuojama ir eritrodiolio bei uvaolio koncentracija ir jų suma miligramais 1 kg riebalinės medžiagos:

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

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

čia:

A_{Er} = eritrodiolio smailės plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais.

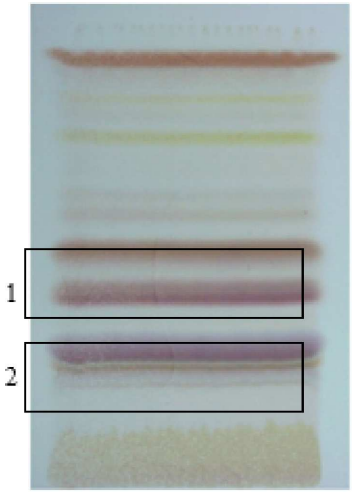
A_{Uv} = uvaolio plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais.

A_s = α-cholestanolio smailės plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais.

m_s = įdėto α-cholestanolio masė miligramais.

m = nustatymui paimto mėginio masė gramais.

Priedėlis



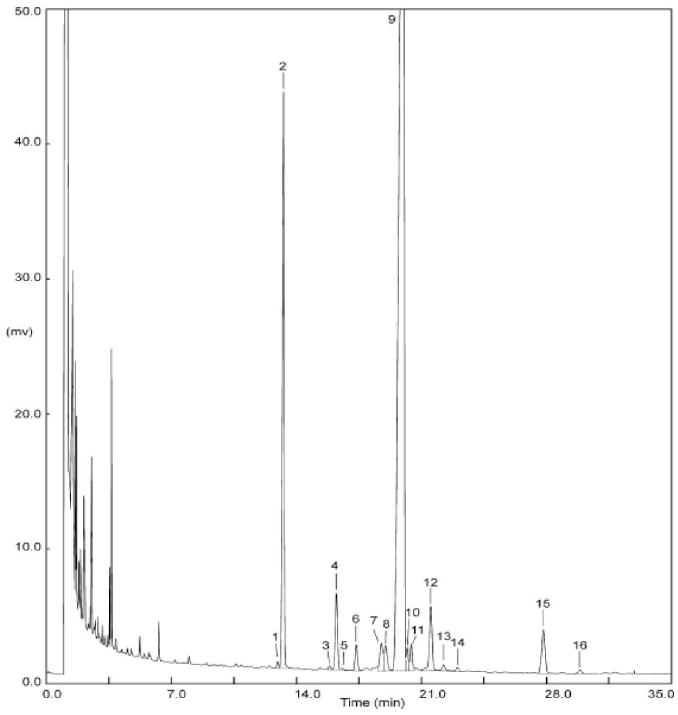
1 Angliavandeniliai
2 α-tokoferolis
3 Prenoliai
4 Triterpeno alkoholiai
5 Alifatiniai alkoholiai
6 Metilsteroliai
7 Steroliai
8 Triterpeno dialkoholiai

1 pav. Alyvuogių išspaudų aliejaus nemuilinamosios frakcijos, du kartus išplautos heksano ir dietileterio mišiniu (65:35), išryškintos su SO4H2 (50 %) ir pakaitintos, plonasluoksnė chromatografija. Juostelės, kurios turi būti nugrandytos, matomos stačiakampyje: 1 – alifatinių alkoholių juostelės, 2 – sterolių ir triterpeno dialkoholių juostelės.

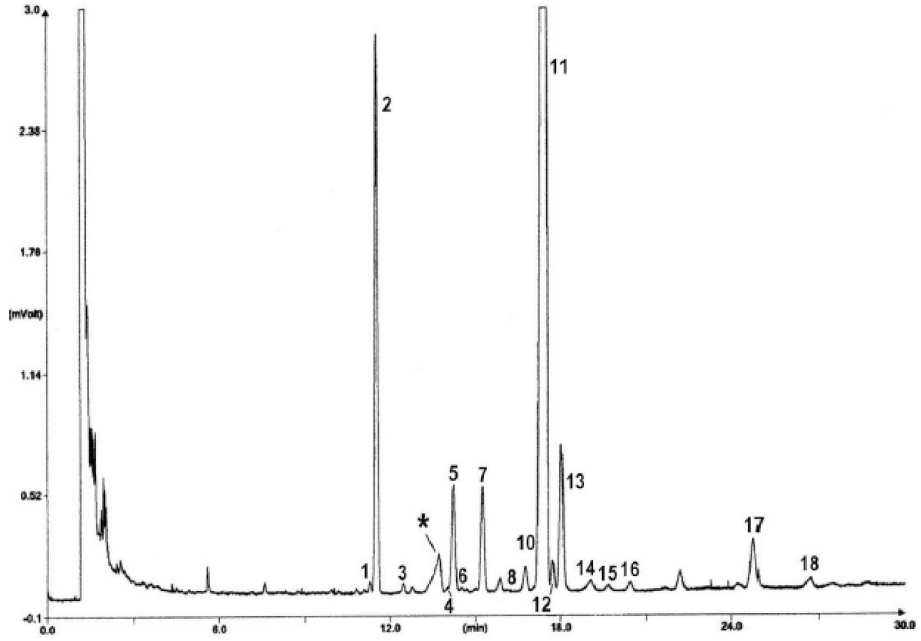
I lentelė. Santykinė sterolių sulaikymo trukmė

Smailė	Identifikacija		Santykinė sulaikymo trukmė	
			SE 54 kolonėlė	SE 52 kolonėlė
1	Cholesterolis	Δ-5-cholesten-3β-olis	0,67	0,63
2	Cholestanolis	5α-cholestan-3β-olis	0,68	0,64
3	Brasikasterolis	[24S]-24-metil-Δ-5,22-cholestadien-3β-olis	0,73	0,71
*	Ergosterolis	[24S]-24-metil-Δ-5,7,22-cholestatrien-3β-olis	0,78	0,76
4	24-metilencholesterolis	24-metilen-Δ-5,24-cholestadien-3β-olis	0,82	0,80
5	Kampesterolis	(24R)-24-metil-Δ-5-cholesten-3β-olis	0,83	0,81
6	Kampestanolis	(24R)-24-metil-cholestan-3β-olis	0,85	0,82
7	Stigmasterolis	(24S)-24-etil-Δ-5,22-cholestadien-3β-olis	0,88	0,87
8	Δ-7-kampesterolis	(24R)-24-metil-Δ-7-cholesten-3β-olis	0,93	0,92
9	Δ-5,23-stigmastadienolis	(24R,S)-24-etil-Δ-5,23-cholestadien-3β-olis	0,95	0,95
10	Klerosterolis	(24S)-24-etil-Δ-5,25-cholestadien-3β-olis	0,96	0,96

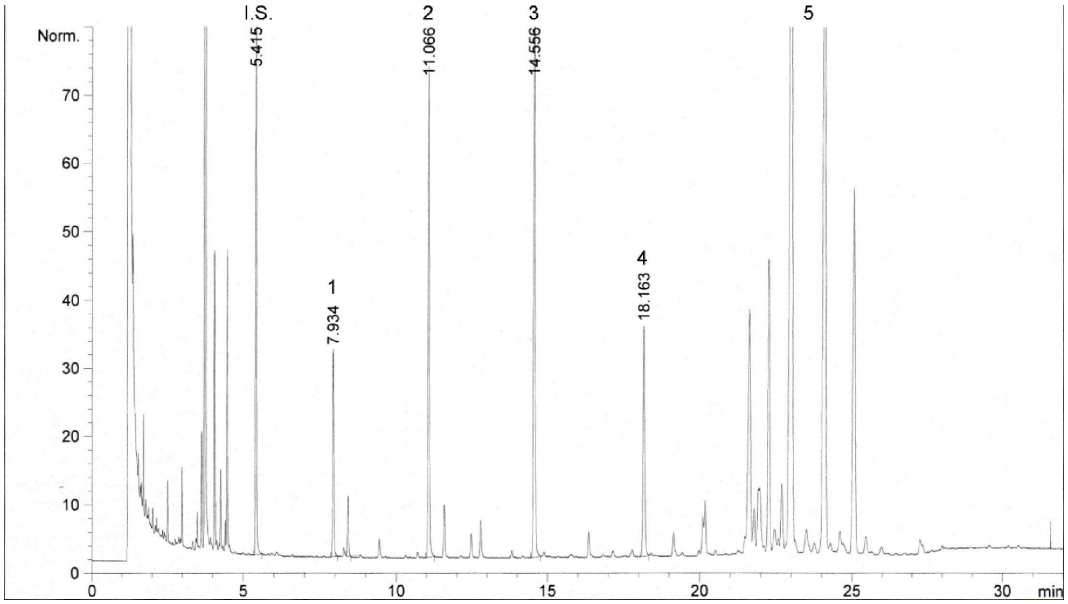
Smailė	Identifikacija		Santykinė sulaikymo trukmė	
			SE 54 kolonėlė	SE 52 kolonėlė
11	β-sitosterolis	(24R)-24-etil-Δ-5-cholesten-3β-olis	1,00	1,00
12	Sitostanolis	24-etilcholestan-3β-olis	1,02	1,02
13	Δ-5-avenasterolis	(24Z)-24-etiliden-Δ-cholesten-3β-olis	1,03	1,03
14	Δ-5,24-stigmastadienolis	(24R,S)-24-etil-Δ-5,24-cholestadien-3β-olis	1,08	1,08
15	Δ-7-stigmastenolis	(24R,S)-24-etil-Δ-7-cholesten-3β-olis	1,12	1,12
16	Δ-7-avenasterolis	(24Z)-24-etiliden-Δ-7-cholesten-3β-olis	1,16	1,16
17	Eritrodiolis	5α-olean-12-en-3β,28-diolis	1,41	1,41
18	Uvaolis	Δ-12-ursen-3β,28-diolis	1,52	1,52



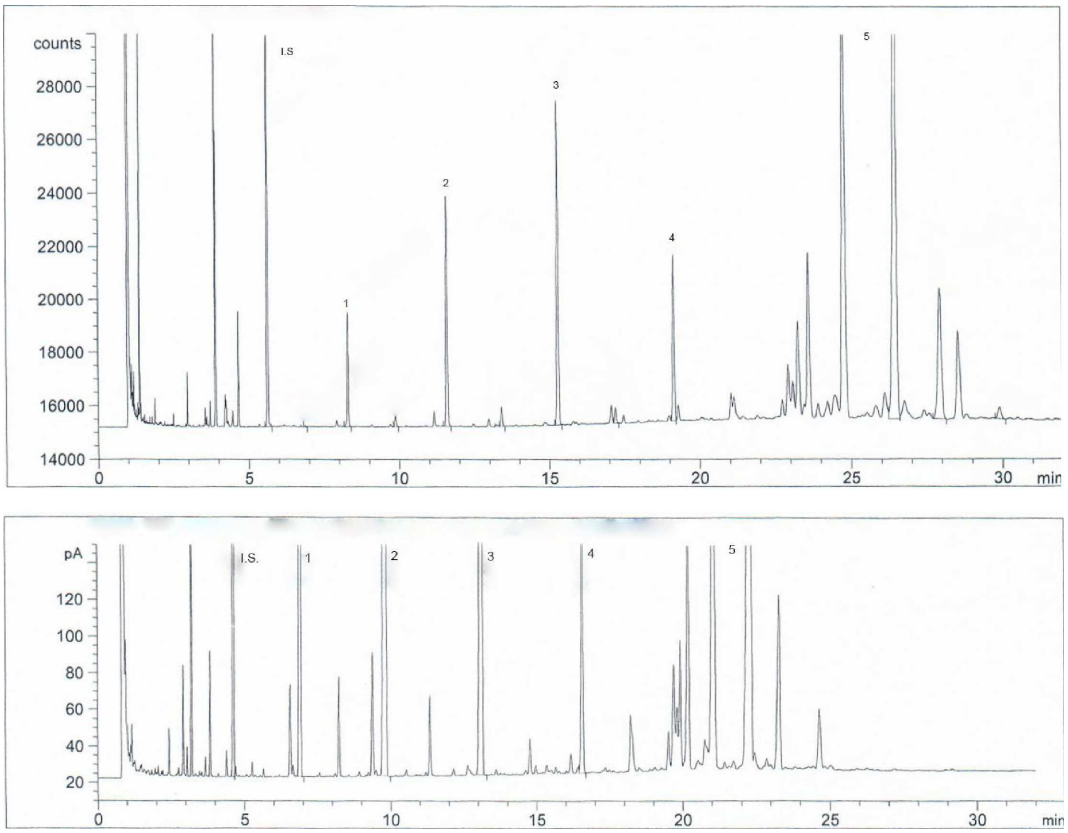
2 pav. Rafinuoto alyvuogių aliejaus sterolio ir triterpeno dialkoholių chromatografinis profilis, tiriant dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi metodu (GC-FID). (1) cholesterolis, (2) α-cholestanolis (I.S.), (3) 24-metilencholesterolis, (4) kampesterolis, (5) kampestanolis, (6) stigmasterolis, (7) Δ5,23-stigmastadienolis, (8) klerosterolis, (9) β-sitosterolis, (10) sitostanolis, (11) Δ5-avenasterolis, (12) Δ5,24-stigmastadienolis, (13) Δ7-stigmastenolis, (14) Δ7-avenasterolis, (15) eritrodiolis, (16) uvaolis.



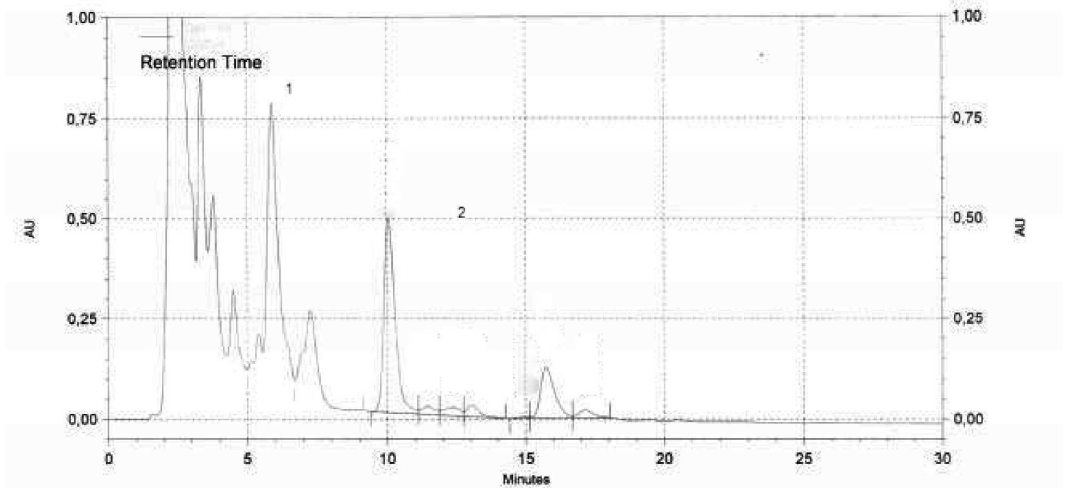
3 pav. Klasikinio alyvuogių aliejaus („lampante“) sterolio ir triterpeno dialkoholių chromatografinis profilis, tiriant dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi metodu (GC-FID). (1) cholesterolis, (2) α-cholestanolis, (3) brasikasterolis, (4) 24-metilencholesterolis, (5) kampesterolis, (6) kampestanolis, (7) stigmasterolis, (8) Δ7-kampesterolis, (9) Δ5,23-stigmastadienolis, (10) klerosterolis, (11) β-sitosterolis, (12) sitostanolis, (13) Δ5-avenasterolis, (14) Δ5,24-stigmastadienolis, (15) Δ7-stigmastenolis, (16) Δ7-avenasterolis, (17) eritrodiolis, (18) uvaolis.



4 pav. Alyvuogių aliejaus alifatinių alkoholių ir triterpeno alkoholių chromatografinis profilis, tiriant dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi metodu (GC-FID). (I.S.) C20-olis, (1) C22-olis, (2) C24-olis, (3) C26-olis, (4) C28-olis, (5) triterpeno alkoholiai.



5 pav. Rafinuoto alyvuogių aliejaus ir antrinio centrifugavimo alyvuogių aliejaus alifatinių alkoholių ir triterpeno alkoholių chromatografinis profilis, tiriant dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi metodu (GC-FID). (I.S.) C20-olis, (1) C22-olis, (2) C24-olis, (3) C26-olis, (4) C28-olis, (5) triterpeno alkoholiai.



6 pav. Nemuilinamosios alyvuogių aliejaus frakcijos, atskirtos efektyviosios skysčių chromatografijos metodu (HPLC), naudojant UV detektorių, HPLC chromatograma. (1) Alifatiniai ir triterpeno alkoholiai; (2) Steroliai ir triterpeno dialkoholiai“