

Този документ е средство за документиране и не обвързва институциите

► **B****РЕГЛАМЕНТ (ЕИО) № 2568/91 НА КОМИСИЯТА**

от 11 юли 1991 година

относно характеристиките на маслиновото масло и маслиновото масло от остатъчен материал и съответните методи за анализ

(ОВ L 248, 5.9.1991 г., стр. 1)

Изменен със:

		Официален вестник		
		№	страница	дата
► <u>M1</u>	Регламент (ЕИО) № 3682/91 на Комисията от 17 декември 1991 година	L 349	36	18.12.1991 г.
► <u>M2</u>	Регламент (ЕИО) № 1429/92 на Комисията от 26 май 1992 година	L 150	17	2.6.1992 г.
► <u>M3</u>	Commission Regulation (EEC) No 1683/92 of 29 June 1992 (*)	L 176	27	30.6.1992 г.
► <u>M4</u>	Commission Regulation (EEC) No 1996/92 of 15 July 1992 (*)	L 199	18	18.7.1992 г.
► <u>M5</u>	Регламент (ЕИО) № 3288/92 на Комисията от 12 ноември 1992 година	L 327	28	13.11.1992 г.
► <u>M6</u>	Регламент (ЕИО) № 183/93 на Комисията от 29 януари 1993 година	L 22	58	30.1.1993 г.
► <u>M7</u>	изменен с регламент (ЕИО) № 826/93 на Комисията от 6 април 1993 година	L 87	6	7.4.1993 г.
► <u>M8</u>	Commission Regulation (EEC) No 620/93 of 17 March 1993 (*)	L 66	29	18.3.1993 г.
► <u>M9</u>	Регламент (ЕО) № 177/94 на Комисията от 28 януари 1994 година	L 24	33	29.1.1994 г.
► <u>M10</u>	Commission Regulation (EC) No 2632/94 of 28 October 1994 (*)	L 280	43	29.10.1994 г.
► <u>M11</u>	Регламент (ЕО) № 656/95 на Комисията от 28 март 1995 година	L 69	1	29.3.1995 г.
► <u>M12</u>	Commission Regulation (EC) No 2527/95 of 27 October 1995 (*)	L 258	49	28.10.1995 г.
► <u>M13</u>	Commission Regulation (EC) No 2472/97 of 11 December 1997 (*)	L 341	25	12.12.1997 г.
► <u>M14</u>	Регламент (ЕО) № 282/98 на Комисията от 3 февруари 1998 година	L 28	5	4.2.1998 г.
► <u>M15</u>	Commission Regulation (EC) No 2248/98 of 19 October 1998 (*)	L 282	55	20.10.1998 г.
► <u>M16</u>	Регламент (ЕО) № 379/1999 на Комисията от 19 февруари 1999 година	L 46	15	20.2.1999 г.
► <u>M17</u>	Commission Regulation (EC) No 455/2001 of 6 March 2001 (*)	L 65	9	7.3.2001 г.
► <u>M18</u>	Commission Regulation (EC) No 2042/2001 of 18 October 2001 (*)	L 276	8	19.10.2001 г.
► <u>M19</u>	Commission Regulation (EC) No 796/2002 of 6 May 2002 (*)	L 128	8	15.5.2002 г.
► <u>M20</u>	Регламент (ЕО) № 1989/2003 на Комисията от 6 ноември 2003 година	L 295	57	13.11.2003 г.
► <u>M21</u>	Регламент (ЕО) № 702/2007 на Комисията от 21 юни 2007 година	L 161	11	22.6.2007 г.
► <u>M22</u>	Регламент (ЕО) № 640/2008 на Комисията от 4 юли 2008 година	L 178	11	5.7.2008 г.
► <u>M23</u>	Регламент (ЕС) № 61/2011 на Комисията от 24 януари 2011 година	L 23	1	27.1.2011 г.
► <u>M24</u>	Регламент за изпълнение (ЕС) № 661/2012 на Комисията от 19 юли 2012 година	L 192	3	20.7.2012 г.

Поправен със:

- **C1** Поправка, ОВ L 78, 24.3.2011 г., стр. 69 (61/2011)

(*) Настоящият акт никога не е публикуван на български език

**РЕГЛАМЕНТ (ЕИО) № 2568/91 НА КОМИСИЯТА****от 11 юли 1991 година****относно характеристиките на маслиновото масло и
маслиновото масло от остатъчен материал и съответните
методи за анализ**

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Регламент № 136/66/ЕИО на Съвета от 22 септември 1996 г. относно създаването на обща организация на пазара на масла и мазнини ⁽¹⁾, последно изменен с Регламент (ЕИО) № 3577/90 ⁽²⁾, и по-специално член 35а от него,

като има предвид, че приложението към Регламент № 136/66/ЕИО съдържа описанието и дефиницията на маслиновото масло и маслиновото масло от остатъчен материал за целите на търговията във всяка държава-членка в рамките на Общността и в търговията с трети страни;

като има предвид, че за целите на разграничаването на различните типове мазнини е необходимо да се определят физическите и химическите характеристики на всяка от тях, както и органолептичните характеристики на необработеното маслиново масло *virgin* с цел гарантиране чистотата и качеството на съответните продукти, без това да засяга други съществуващи разпоредби;

като има предвид, че наличието на характеристиките на различните типове мазнини трябва да се определя по еднакъв начин в рамките на цялата Общност; като има предвид, че за тази цел трябва да се установят общностни методи за химически и органолептичен анализ; като има предвид, че за известен преходен период трябва да се позволи използването на други методи за анализ, прилагани в държавите-членки, като при наличие на разлика в резултатите, получените с помощта на общия метод ще бъдат решаващи;

като има предвид, че определянето на физическите и химически характеристики на маслиновото масло и на методите за анализ води до изменение на допълнителните бележки към глава 15 от Комбинираната номенклатура;

като има предвид, че методът за органолептичен анализ на необработеното маслиново масло *virgin* включва създаването на групи от подбрани дегустатори; като има предвид, че срокът, необходим за създаването на подобна структура, трябва по тази причина да бъде определен; като има предвид, че с оглед трудностите, които някои държави-членки ще срещнат при създаването на групи от дегустатори, трябва да се даде разрешение за използването на групи в други държави-членки;⁽¹⁾ ОВ 172, 30.9.1966 г., стр. 3025/66.⁽²⁾ ОВ L 353, 17.12 1990 г., стр. 23.

▼B

като има предвид, че с цел осигуряване правилното функциониране на системата от такси върху вноса на остатъчни материали от преработката на маслини, трябва да се приеме общ метод за определяне масленото съдържание на тези продукти;

като има предвид, че с цел да не се вреди на търговията, трябва да се предвиди разпореда за реализирането в кратък срок на пакетизираното маслиново масло преди влизането в сила на настоящия регламент;

като има предвид, че е необходима отмяната на Регламент (ЕИО) № 1058/77 на Комисията ⁽¹⁾, последно изменен с Регламент (ЕИО) № 1858/88 ⁽²⁾;

като има предвид, че Управителният комитет по масла и мазнини не е дал становище в срока, определен от неговия председател,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

▼M20*Член 1*

1. Масло, чиито характеристики отговарят на посочените в точки 1 и 2 от приложение I към настоящия регламент, се считат за необработено маслиново масло *virgin* по смисъла на точка 1, а) и б) от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

2. Масло, чиито характеристики отговарят на посочените в точка 3 от приложение I към настоящия регламент се счита за маслиново масло за осветление по смисъла на точка 1, в) от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

3. Масло, чиито характеристики отговарят на посочените в точка 4 от приложение I към настоящия регламент се счита за рафинирано маслиново масло по смисъла на точка 2 от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

4. Масло, чиито характеристики отговарят на посочените в точка 5 от приложение I към настоящия регламент се счита за маслиново масло съставено от рафинирани маслинови масла и необработени маслинови масла *virgin* по смисъла на точка 3 от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

5. Масло, чиито характеристики отговарят на посочените в точка 6 от приложение I към настоящия регламент се счита за сурово маслиново масло от остатъчен материал по смисъла на точка 4 от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

6. Масло, чиито характеристики отговарят на посочените в точка 7 от приложение I към настоящия регламент се счита за рафинирано маслиново масло от остатъчен материал по смисъла на точка 5 от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

7. Масло, чиито характеристики отговарят на посочените в точка 8 от приложение I към настоящия регламент се счита за маслиново масло от остатъчен материал по смисъла на точка 6 от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

⁽¹⁾ ОВ L 128, 24.5.1977 г., стр. 6.

⁽²⁾ ОВ L 166, 1.7.1988 г., стр. 10.

▼ B*Член 2*

1. Характеристиките на маслата, установени в приложение I, се определят в съответствие с методите, описани по-долу:

- за определяне на свободните мастни киселини, изразени като процент олеинова киселина, се използва методът, описан в приложение II,
- за определяне на пероксидното число се използва методът, описан в приложение III,

▼ M19

- for determination of the wax content, the method given in Annex IV,

▼ B

- за определяне на стеролното съдържание се използва методът, описан в приложение V,
- за определяне на еритродиола и уваола се използва методът, описан в приложение VI,

▼ M21

- за определянето на процентното съдържание на 2-глицерил монопалмитат, методът, цитиран в приложение VII,

▼ M20

▼ B

- за спектрофотометричен анализ се използва методът, описан в приложение IX,
- за определяне състава на мастната киселина се използва методът, описан в приложение X А и X Б,
- за определяне на летливите халоген-съдържащи разтворители се използва методът, описан в приложение XI,
- за анализа на органолептичните характеристики на студено пресованото маслиново масло се използва методът, описан в приложение XII,

▼ M20

▼ M11

- за определяне на стигмастидиени, методът, определен в приложение XVII,

▼ M13

- for determining the content of triglycerides with ECN42, the method set out in Annex XVIII,

▼ M19

- for determination of the aliphatic alcohol content, the method given in Annex XIX,

▼ M23

- за установяване на съдържанието на восъци, етилови естери на мастни киселини и метилови естери на мастни киселини посредством капилярна газова хроматография — методът, определен в приложение XX.

▼ M19

2. Verification by national authorities or their representatives of the organoleptic characteristics of virgin oils shall be effected by tasting panels approved by the Member States.

The organoleptic characteristics of an oil as referred to in the first subparagraph shall be deemed consonant with the category declared if a panel approved by the Member State confirms the grading.

Should the panel not confirm the category declared as regards the organoleptic characteristics, at the interested party's request the national authorities or their representatives shall have two counter-assessments carried out by other approved panels, at least one by a panel approved by the producer Member State concerned. The characteristics concerned shall be deemed consonant with the characteristics declared if at least two of the counter-assessments confirm the declared grade. If that is not the case, the interested party shall be responsible for the cost of the counter-assessments.

▼ M17

3. When the national authorities or their representatives verify the characteristics of the oil as provided for in paragraph 1, samples shall be taken in accordance with international standards EN ISO 661 on the preparation of test samples and EN ISO 5555 on sampling. However, notwithstanding point 6.8 of standard EN ISO 5555, in the case of batches of such oils in immediate packaging not exceeding 100 litres, the sample shall be taken in accordance with Annex Ia to this Regulation.

▼ M19

Without prejudice to standard EN ISO 5555 and Chapter 6 of standard EN ISO 661, the samples taken shall be put in a dark place away from strong heat as quickly as possible and sent to the laboratory for analysis no later than:

— the tenth working day after they are taken, during the period from October to May, and

— the fifth working day after they are taken, during the period from June to September.

▼ M17

4. ► **M20** За целите на проверката, предвидена в параграф 3, анализите посочени в приложения II, III, IX, X и XII, и където е приложимо, всички необходими контра-анализи в съответствие с националното законодателство трябва да бъдат проведени преди датата на минималната трайност. Когато пробите са взети повече от четири месеца преди датата на минималната трайност, анализите се провеждат не по-късно от четвъртия месец след месеца, в който е взета пробата. За другите анализи, предвидени в посочения регламент, не се прилага срок. ◀

▼ M17

Unless the sample was taken less than one month before the minimum durability date, if the results of the analyses do not match the characteristics of the category of olive oil or olive-residue oil declared, the party concerned shall be notified no later than one month before the end of the period laid down in the first subparagraph.

▼ M19

5. For the purpose of determining the characteristics of olive oils by the methods provided for in paragraph 1, the analysis results shall be directly compared with the limits laid down in this Regulation.

▼ M20*Член 2а*

Националните власти или техните представители могат да проверяват дали една мостра съответства на декларираната категория:

- а) чрез провеждане, независимо от последователността, на анализите, предвидени в приложение I;
- б) или като се следва редът, посочен в приложение Ib за схемата на решения, докато бъде достигнато едно от решенията, съдържащо се в схемата на решения.

▼ M19**▼ M5***Член ► M19 3 ◀*

Ако се установи, че органолептичните характеристики на маслиното масло не отговарят на описанието им, заинтересуваните държави-членки, без да се засягат останалите санкции, налагат административно-финансови наказания, чийто размер се определя в зависимост от степента на констатираната нередност.

При оценяването на нередността се обръща специално внимание на естествените изменения в характеристиките на маслиното масло, настъпващи при нормални условия на съхранение.

В началото на всяко полугодие държавите-членки информират Комисията за броя и вида на констатираните нередности и за наложените наказания през предходното полугодие.

*Член 4***▼ M19**

1. The Member States may approve assessment panels so that national authorities or their representatives can assess and verify organoleptic characteristics.

The terms of approval shall be set by Member States and ensure that:

- the requirements of Annex XII.4 are met,
- the panel head is given training recognised for this purpose by the Member State,

▼ M19

— continued approval depends on performance in annual checks arranged by the Member State.

Member States shall notify to the Commission a list of approved panels and the action taken under this paragraph.

▼ M5

2. Когато държавите-членки изпитват затруднения при създаването на групи от дегустатори на тяхната територия, те могат да се обърнат към група от дегустатори, одобрени в друга държава-членка.

3. Всяка държава-членка съставя списък на групите от дегустатори, създадени от професионални или междубраншови организации в съответствие с условията, установени в параграф 1 и гарантира, че тези условия се спазват.

▼ M19**▼ B***Член 6*

1. Масленото съдържание на кюспето и другите остатъчни материали от добиването на маслиново масло (кодове по КН 2306 90 11 и 2306 90 19) се определя чрез използване на метода, изложен в приложение XV.

2. Масленото съдържание, посочено в параграф 1, се изразява като процентно съотношение от теглото на маслото към теглото на сухото вещество.

▼ M20*Член 7*

Разпоредбите на Общността, отнасящи се до наличието на примеси се прилагат:

По отношение на халогенираните разтворители, ограниченията за всички категории маслиново масло са, както следва:

— максималното съдържание на открит халогениран разтворител: 0,1 mg/kg.

— максималното общо съдържание на открити халогенирани разтворители: 0,2 mg/kg.

▼ B*Член 8*

1. Държавите-членки уведомяват Комисията за предприетите мерки по прилагането на настоящия регламент.

2. В началото на всяко полугодие държавите-членки изпращат на Комисията извлечение с аналитичните данни от тестовите, проведени в хода на предходното полугодие.

▼B

Резултатите се разглеждат от Управителния комитет по масла и мазнини в съответствие с процедурата, установена в член 39 от Регламент № 136/66/ЕИО.

Член 9

Регламент (ЕИО) № 1058/77 се отменя.

Член 10

1. Настоящият регламент влиза в сила на третия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейските общности*.

Въпреки това методът, описан в приложение XII, се прилага от ►**M1** 1 ноември 1992 г. ◀, освен за действия, свързани с режима на интервенция.

▼M5

Този метод не се прилага за необработено маслиново масло, подготвено за предлагане на пазара преди 1 ноември 1992 г.

▼B

2. Настоящият регламент не се прилага спрямо маслиновото масло и маслиновото масло от остатъчен материал, опаковани преди неговото влизане в сила и пуснати на пазара до 31 октомври 1992.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави-членки.

▼ B*ПРИЛОЖЕНИЯ***Съдържание**

Приложение I:	Характеристики на видовете маслиново масло
Приложение Ia:	Вземане на проби маслиново масло или маслиново масло от остатъчен материал при директно опаковане на не повече от 100 литра
Приложение Ib:	Схема на решенията
Приложение II:	► M21 Определяне на свободните мастни киселини, студен метод ◀
Приложение III:	Определяне на пероксидното число
Приложение IV:	Определяне на съдържанието на парафини чрез капилярна газова хроматография
Приложение V:	Определяне състава и съдържанието на стероли чрез капилярноколонкова газова хроматография
Приложение VI:	Определяне на съдържанието на еритродиол и уваол
Приложение VII:	► M21 Определяне на процентното съдържание на 2-глицерил монопалмитат ◀

▼ M20**▼ B**

Приложение IX:	Спектрофотометрично изследване в ултравиолетовия спектър
Приложение X A:	Газовохроматографски анализ на метиловите естери на мастните киселини
Приложение X Б:	Създаване на метил естери на мастни киселини
Приложение XI:	Определяне на халоген-съдържащите разтворители на маслиновото масло
Приложение XII:	Органолептична експертиза на необработено маслиново масло virgin

▼ M20**▼ M19****▼ B**

Приложение XV:	Маслено съдържание на остатъчния материал
Приложение XVI:	Определяне стойността на йодното число
Приложение XVII:	Определяне на стигмастидени в растителни масла
Annex XVIII:	Method for determining the content of triglycerides with ECN42
Annex XIX:	Method for determining aliphatic alcohol content

▼ M23

Приложение XX:	Метод за установяване на съдържанието на въсьци, етилови естери на мастни киселини и метилови естери на мастни киселини посредством капилярна газова хроматография
----------------	--

ПРИЛОЖЕНИЕ I

ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ВИДОВЕТЕ МАСЛИНОВО МАСЛО

Категория	Етилови естери на мастни киселини (FAME) и метилови естери на мастни киселини (FAEE)	Киселин- ност (%) (*)	Прекисно число mEq O ₂ /kg (*)	Парафини mg/kg (**)	2-глицерил монопалмитат (%)	Стигмас- тадиен mg/kg ⁽¹⁾	Разлика: ECN42 (HPLC) - ECN42 теоретич- но пресмята- не	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	ΔK (*)	Органолептич- на оценка Средна стойност на дефектите (Md) (*)	Органолептич- на оценка Средна стойност на плодовия аромат (Mf) (*)
1. Необработено маслиново масло екстра качество	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg или $75 \text{ mg/kg} \leq \Sigma$ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg и (FAEE/FAME) $\leq 1,5$	$\leq 0,8$	≤ 20	≤ 250	$\leq 0,9$ ако сумарният % палмитинова киселина ≤ 14 % $\leq 1,0$ ако сумарният % палмитинова киселина > 14 %	$\leq 0,10$	$\leq 0,2$	$\leq 2,50$	$\leq 0,22$	$\leq 0,01$	Md = 0	Mf > 0
2. Необработено маслиново масло	—	$\leq 2,0$	≤ 20	≤ 250	$\leq 0,9$ ако сумарният % палмитинова киселина ≤ 14 % $\leq 1,0$ ако сумарният % палмитинова киселина > 14 %	$\leq 0,10$	$\leq 0,2$	$\leq 2,60$	$\leq 0,25$	$\leq 0,01$	►C1 Md $\leq 3,5$ ◀	Mf > 0
3. Маслиново масло за осветление	—	$> 2,0$	—	≤ 300 ⁽³⁾	$\leq 0,9$ ако сумарният % палмитинова киселина ≤ 14 % $\leq 1,1$ ако сумарният % палмитинова киселина > 14 %	$\leq 0,50$	$\leq 0,3$	—	—	—	►C1 Md $> 3,5$ ⁽²⁾ ◀	—
4. Рафинирано маслиново масло	—	$\leq 0,3$	≤ 5	≤ 350	$\leq 0,9$ ако сумарният % палмитинова киселина ≤ 14 % $\leq 1,1$ ако сумарният % палмитинова киселина > 14 %	—	$\leq 0,3$	—	$\leq 1,10$	$\leq 0,16$	—	—

▼ M23

Категория	Етилови естери на мастни киселини (FAME) и метилови естери на мастни киселини (FAEE)	Киселинност (%) (*)	Прекисно число mEq O ₂ /kg (*)	Парафини mg/kg (**)	2-глицерил монопалмитат (%)	Стигматидиен mg/kg ⁽¹⁾	Разлика: ECN42 (HPLC) - ECN42 теоретично пресмятане	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	ΔK (*)	Органолептична оценка Средна стойност на дефектите (Md) (*)	Органолептична оценка Средна стойност на плодовия аромат (Mf) (*)
5. Маслиново масло — смес от рафинирано и от висококачествено маслиново масло	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 ако сумарният % палмитинова киселина ≤ 14 % ≤ 1,0 ако сумарният % палмитинова киселина > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Сурово маслиново масло от остатъчен материал	—	—	—	> 350 ⁽⁴⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Рафинирано маслиново масло от остатъчен материал	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Маслиново масло от остатъчен материал	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

⁽¹⁾ Общо количество на изомерите, които могат (или не могат) да бъдат отделени чрез капилярна колона.

⁽²⁾ Или когато средната стойност на дефектите е по-малка или равна на ►C1 3,5 ◄, а средната стойност на плодовия аромат е равна на 0.

⁽³⁾ Масло със съдържание на восъци между 300 mg/kg и 350 mg/kg се определя като масло за осветление, ако общото съдържание на алифатни алкохоли е по-малко или равно на 350 mg/kg или ако процентното съдържание на еритродиол и уваол е по-малко или равно на 3,5 %.

⁽⁴⁾ Масло със съдържание на восъци между 300 mg/kg и 350 mg/kg се определя като сурово маслиново масло от остатъчен материал, ако общото съдържание на алифатни алкохоли е над 350 mg/kg и ако процентното съдържание на еритродиол и уваол е над 3,5 %.

Категория	Съдържание на киселини ⁽¹⁾						Общо кол. транс-олеинови изомери (%)	Общо кол. транс-линолови + транс-линоленови изомери (%)	Съдържание на стероли						Общо стероли (mg/kg)	Еритрод-иол и уваол (%) ^(**)
	Миристинова (%)	Линоленова (%)	Арахиднова (%)	Ейкозенова (%)	Бехенова (%)	Лигноцеринова (%)			Холестерол (%)	Брасикастерол (%)	Кампестерол (%)	Стигмастерол (%)	Бетаситостерол ⁽²⁾ (%)	Делта-7-Стигмастенол (%)		
1. Необработено маслиново масло екстра качество	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	≤ Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Необработено маслиново масло	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	≤ Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Маслиново масло за осветление	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Рафинирано маслиново масло	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	≤ Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Маслиново масло — смес от рафинирано и необработено	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	≤ Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Сурово маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾
7. Рафинирано маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	≤ Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	≤ Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Съдържание на други мастни киселини (%): палмитинова: 7,5 - 20,0; палмитолеинова: 0,3 - 3,5; хептадеканова: ≤0,3; хептадеценнова: ≤0,3; стеаринова: 0,5 - 5,0; олеинова: 55,0 - 83,0; линолова: 3,5 - 21,0

⁽²⁾ Сбор от : делта-5,23-сигмастадиенол+хлестерол+бета-ситостерол+ситостанол+делта-5-авенастерол+делта-5,24-стигмастадиенол.

⁽³⁾ Масло със съдържание на восъци между 300 mg/kg и 350 mg/kg се счита за маслиново масло за осветление, ако общото съдържание на алифатни алкохоли е по-малко или равно на 350 mg/kg или ако процентното съдържание на еритродиол и уваол е по-малко или равно на 3,5 %.

⁽⁴⁾ Масло със съдържание на восъци между 300mg/kg и 350 mg/kg се счита за сурово маслиново масло от остатъчен материал, ако общото съдържание на алифатни алкохоли е над 350 mg/kg и ако процентното съдържание на еритродиол и уваол е над 3,5.

Забележки:

- Резултатите от анализите трябва да бъдат изразени с толкова знака след запетаята, с колкото се дава всяка една характеристика. Последното число трябва да бъде увеличено с една единица, ако следващото число е по-голяма от 4.
- Ако дори само една характеристика не отговаря на посочените стойности, категорията на маслото може да бъде променена или маслото да бъде обявено за нечисто съгласно настоящия регламент.
- Ако характеристиките, които се отнасят за качеството на маслото, са обозначени със звездичка (*), това означава, че:
 - за маслиновото масло за осветление може и двете съответни граници да бъдат различни от посочените стойности;
 - за необработеното маслиново масло, ако поне една от тези граници е различна от посочените стойности, категорията на растителното масло се променя независимо от това, че то все още се класифицира в някоя от категориите на висококачественото маслиново масло.
- Ако характеристиките, които се отнасят до качеството на маслото са обозначени с две звездички (**) това означава, че за всички видове маслиново масло от остатъчен материал не е задължително едновременно и двете съответни граници да отговарят на посочените стойности.

▼ M20

ПРИЛОЖЕНИЕ Ia

Вземане на проби маслиново масло или маслиново масло от остатъчен материал при директно опаковане на не повече от 100 литра

Методът на вземане на проби се прилага за доставки на маслиново масло или маслиново масло от остатъчен материал, непревишаващи 125 000 литра, поставени в директни опаковки, непревишаващи 100 литра.

Ако доставката превишава 125 000 литра, тя трябва да бъде разделена на партии от по 125 000 литра или по-малко. Ако доставката е по-малка от 125 000 литра, тя трябва да представлява една партия. След това методът се прилага за всяка партия.

Минималният брой на подлежащите на вземане първични проби се определя от размера на партидата в съответствие със съставената в точка 1 таблица.

Размерът на първичната проба се определя на базата на капацитета на директното пакетирание в съответствие със съставената в точка 2.1 таблица.

Доставката, първичната проба и лабораторната проба трябва да отговарят на определенията, посочени в стандарт EN ISO 5555.

Под „партия“ се разбира набор продажни единици, които са произведени, изработени и опаковани в условия, позволяващи маслото, съдържащо се във всяка продажна единица да бъде считано за хомогенно в смисъла на всички аналитични характеристики.

1. БРОЙ НА НЕОБХОДИМИТЕ ПЪРВИЧНИ ПРОБИ

Минималният брой на необходимите първични проби се определя от размера на партидата в съответствие със следната таблица:

Размер на партия (в литри) по-малък от	Минимален брой на първичните проби
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125 000	5

Избраните за формиране на първична проба директни опаковки трябва да бъдат съседни една на друга в партидата.

В случай на съмнение, държавите-членки увеличават броя на първичните проби, подлежащи на вземане.

2. СЪДЪРЖАНИЕ НА ПЪРВИЧНИТЕ ПРОБИ**2.1 Първичните проби трябва да съдържат следното:**

Когато директното опаковане е с капацитет от:	Първичната проба трябва да съдържа масло от:
а) 5 литра или повече	а) 3 директни опаковки
б) 3 литра или повече, но по-малко от 5 литра	б) 3 директни опаковки
в) 2 литра или повече, но по-малко от 3 литра	в) 3 директни опаковки
г) 1 литър или повече, но по-малко от 2 литра	г) 6 директни опаковки
д) 0,75 литра или повече, но по-малко от 1 литър	д) 6 директни опаковки
е) по-малко от 0,75 литра	е) тройно количество от растителното масло от минималния брой опаковки с общ капацитет повече от 1,5 литра

▼ M20

2.2. **Първичните проби следва да бъдат съхранявани в директни опаковки до времето за анализ. След това масло в първичните проби се разделя на три лабораторни проби, за да могат да бъдат извършени:**

- а) анализите, посочени в приложения II, III, IX и X,
- б) анализът, посочен в приложение XII,
- в) другите анализи.

2.3. **опаковките, съдържащи първични проби, се разделят в съответствие с националното законодателство.**

3. АНАЛИЗИ И РЕЗУЛТАТИ

а) Всяка от първичните проби, посочени в точка 1, се разделя на лабораторни проби в съответствие с точка 2.5 от стандарт EN ISO 5555 и се анализира, както следва:

- определяне на свободни мастни киселини, както е посочено в първото тире на член 2, параграф 1,
- определяне пероксидната стойност, както е посочено във второто тире на член 2, параграф 1,
- спектрофотометричен анализ, както е посочено в осмото тире на член 2, параграф 1,
- определяне състава на мастната киселина, както е посочено в деветото тире на член 2, параграф 1.

б) в случаите, когато един от резултатите от анализите, посочени в а) за на-малко една от първичните проби, взети от същата партида, не отговаря на характеристиките на декларираната категория масло, цялата въпросна партида се обявява за неотговаряща.

В случаите, когато резултатите от анализите посочени в буква а) за всяка от първичните проби взети от същата партида са нееднородни, предвид характеристиките на повторемост на въпросните методи, цялата партида се обявява за нееднородна и всяка първична проба подлежи на други необходими анализи. В противен случай, една първична проба от партидата подлежи на останалите необходими анализи.

в) в случаите, когато един от резултатите от анализите, посочени във втория параграф на буква б) не отговаря на характеристиките на обявената категория масло, цялата партида се обявява за неотговаряща.

В случаите, когато всички резултати от анализите, посочени във втория параграф на буква б) отговарят на характеристиките на обявената категория масло, цялата партида се обявява за отговаряща.

▼ **M20***ПРИЛОЖЕНИЕ 16***СХЕМА НА РЕШЕНИЯТА ЗА ПРОВЕРКА НА СЪВМЕСТИМОСТТА НА ПРОБАТА ОТ МАСЛИНОВО МАСЛО С ДЕКЛАРИРАНАТА КАТЕГОРИЯ**

Анализът за проверка на съвместимостта на едно маслиново масло или маслиново масло от остатъчен материал с декларираната категория може да бъде извършен:

- а) чрез извършване в случаен ред на анализите, предвидени за целта на проверката на съвместимостта с характеристиките, определени в приложение I; или
- б) чрез извършване в реда, показан в схемата на решенията на определените в него анализи, докато бъде достигнато едно от решенията, съдържащи се в схемата на решенията.

Анализите, свързани с примесите, необходими за проверка на съвместимостта със стандартите на Европейската Общност, трябва да бъдат извършени отделно.

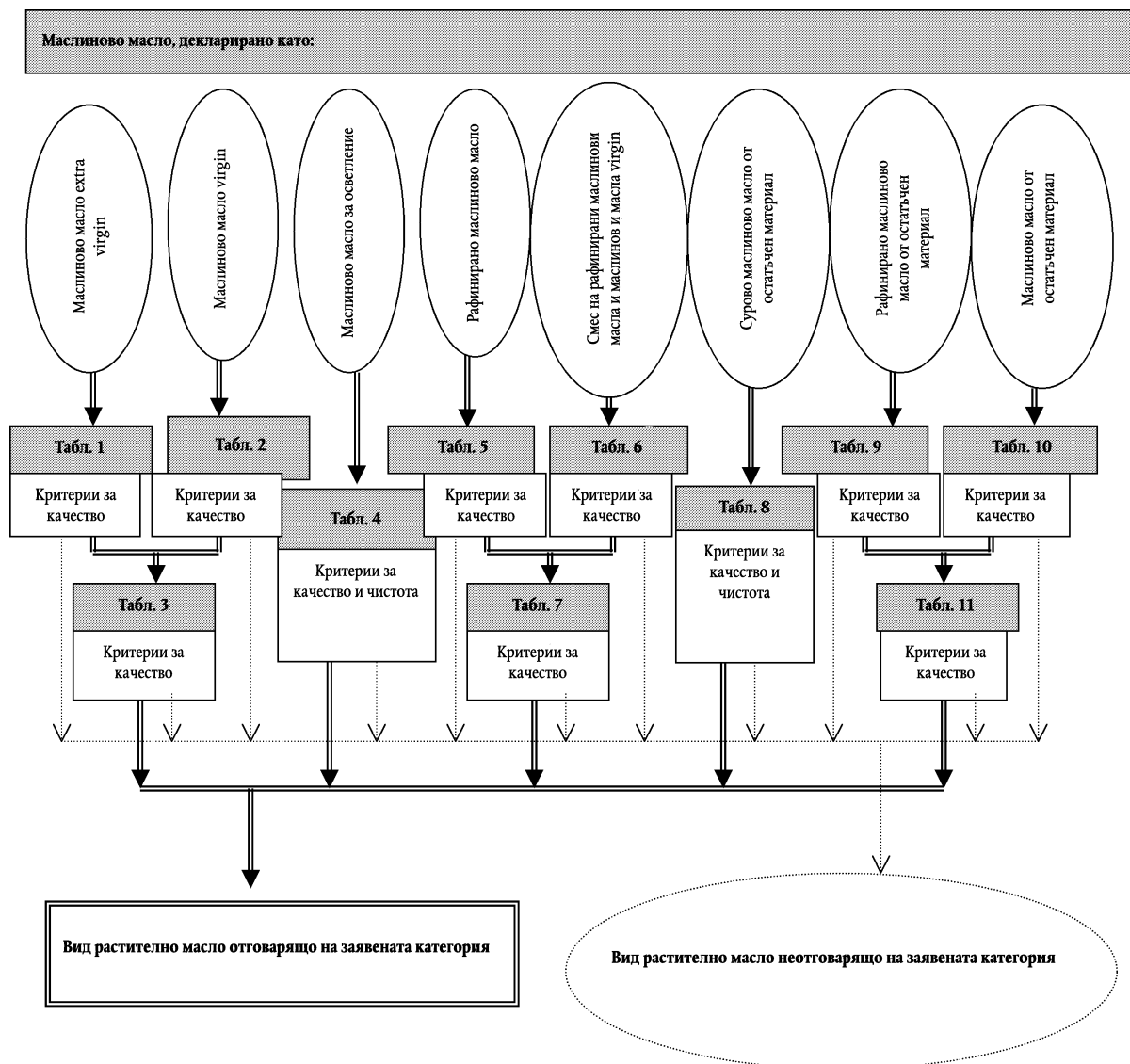
Схемата на решенията важи за всички категории маслиново масло и маслиново масло от остатъчен материал. То се състои от таблици номерирани от 1 до 11, които трябва да бъдат третираны на базата на декларираната категория на въпросното масло в реда, определен в общата таблица.

Легенда за общите таблици до 11:

- двойна линия (=) показва маршрута, който трябва да бъде следван в случай на съответствие (положителен отговор) с критериите определени в предходната клетка. Пунктираната линия (...) показва алтернативния маршрут, който трябва да бъде следван в случай на несъответствие,
- позициите в клетките в таблици от 1 до 11 се отнасят до анализите, предвидени в настоящия регламент на базата на таблицата за съответствие, определена в приложение I към настоящото приложение;
- буквите в скоби, съдържащи се в кръговете на отрицателните решения в таблици от 1 до 11 се отнасят до указваща информация, дадена в допълнение 2 към настоящото приложение. Буквите сами по себе си не водят до задължението да се следват анализите и не предполагат истинността на изказаните предположения.

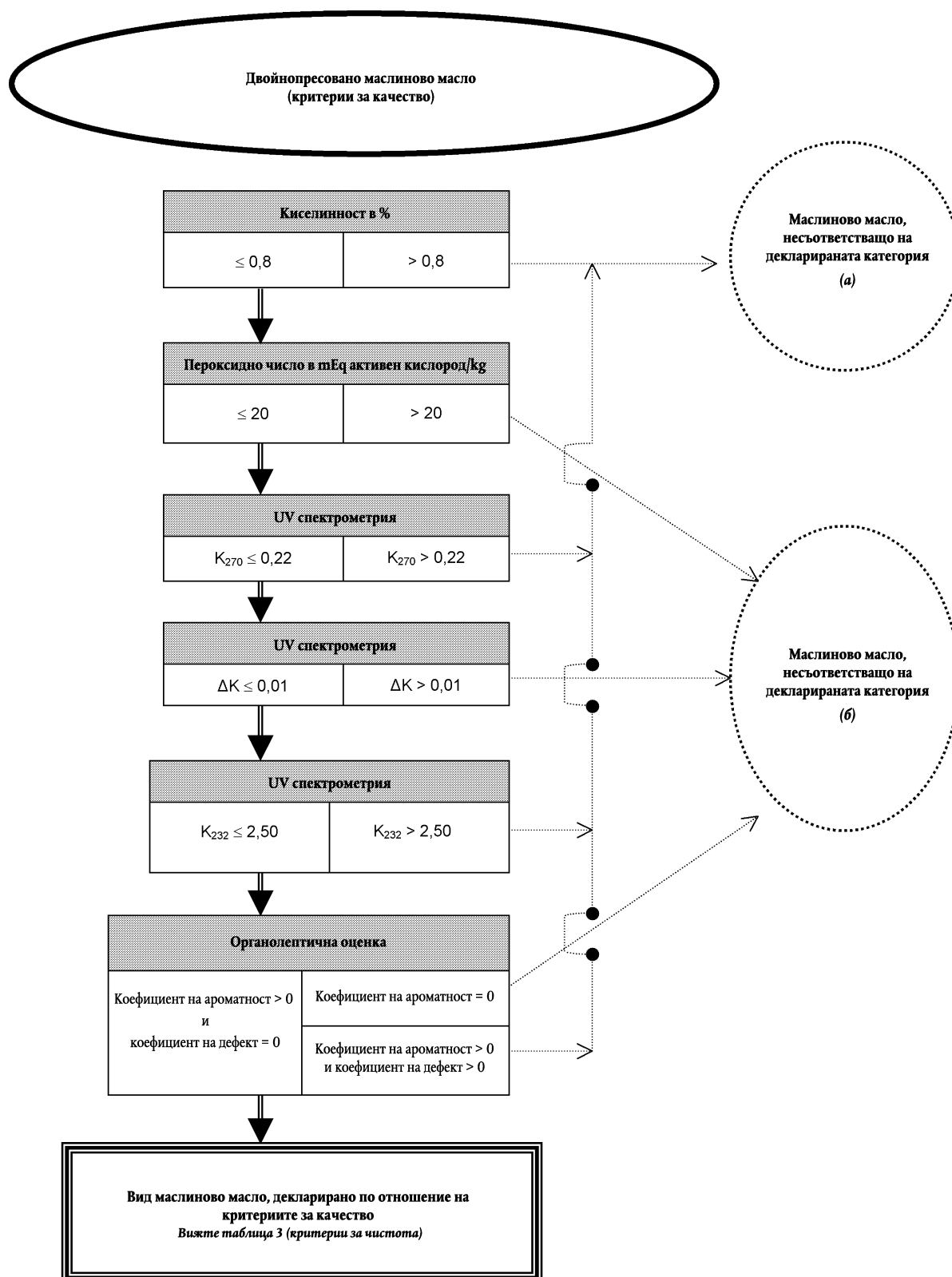
▼ M20

Обща таблица



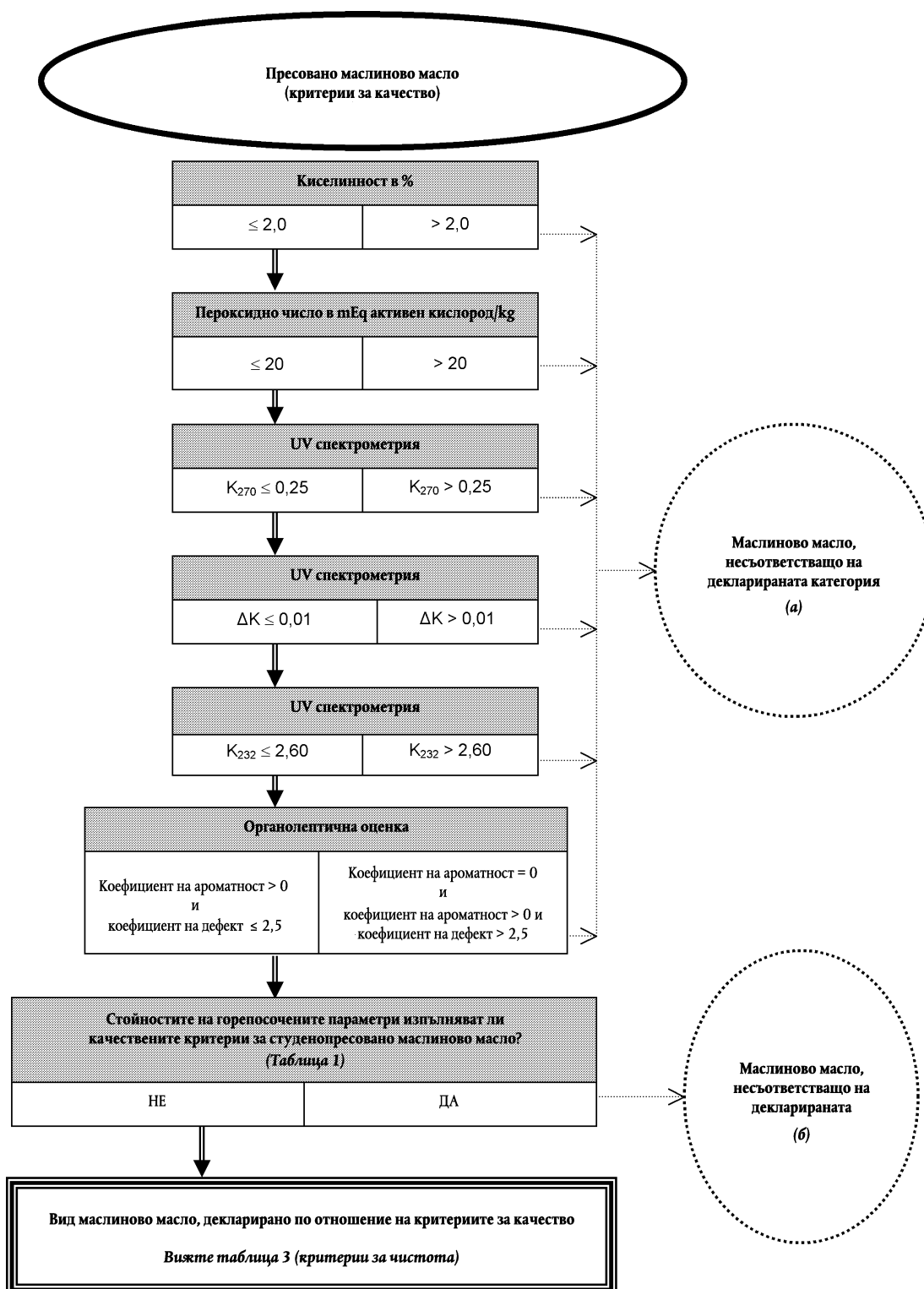
▼ M20

Таблица 1



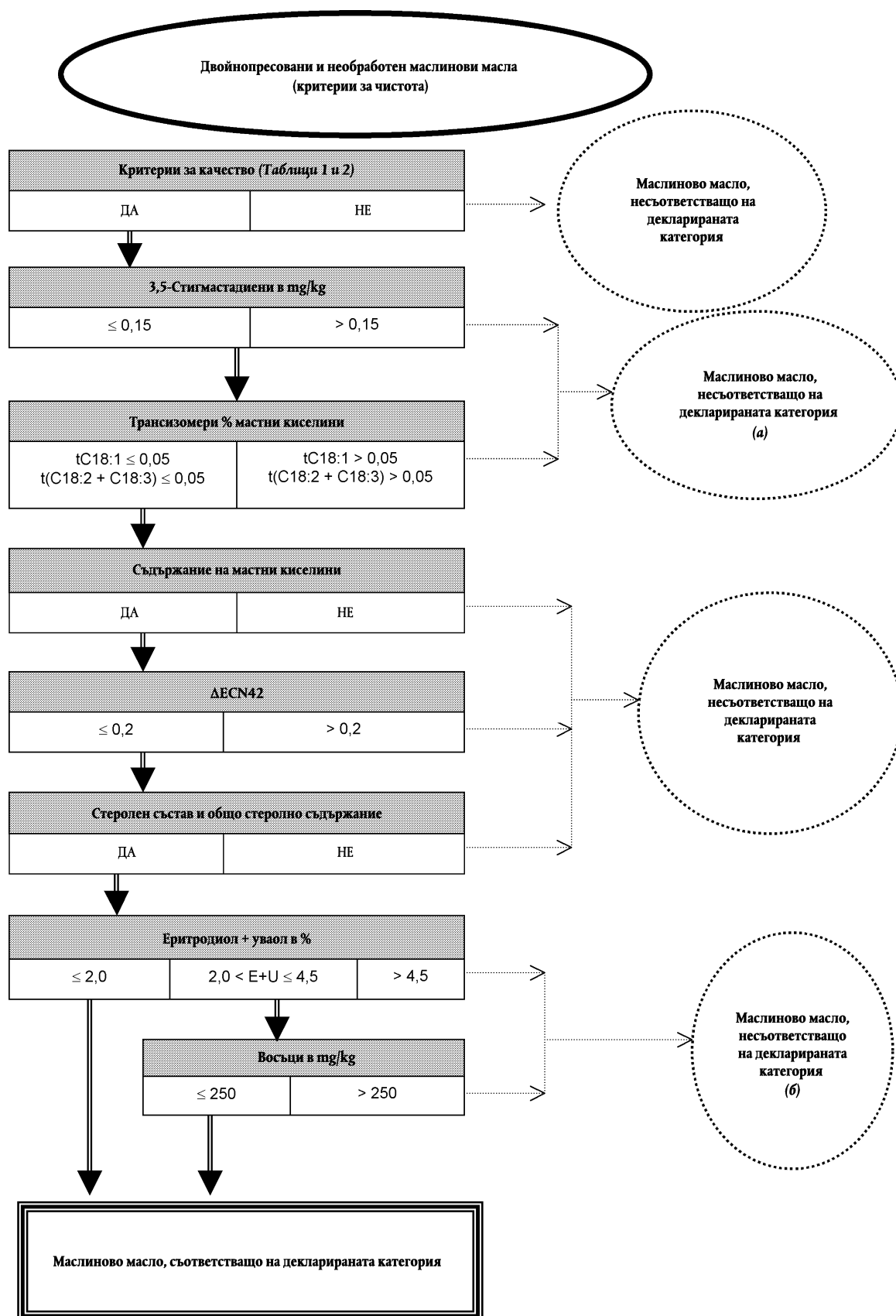
▼ M20

Таблица 2



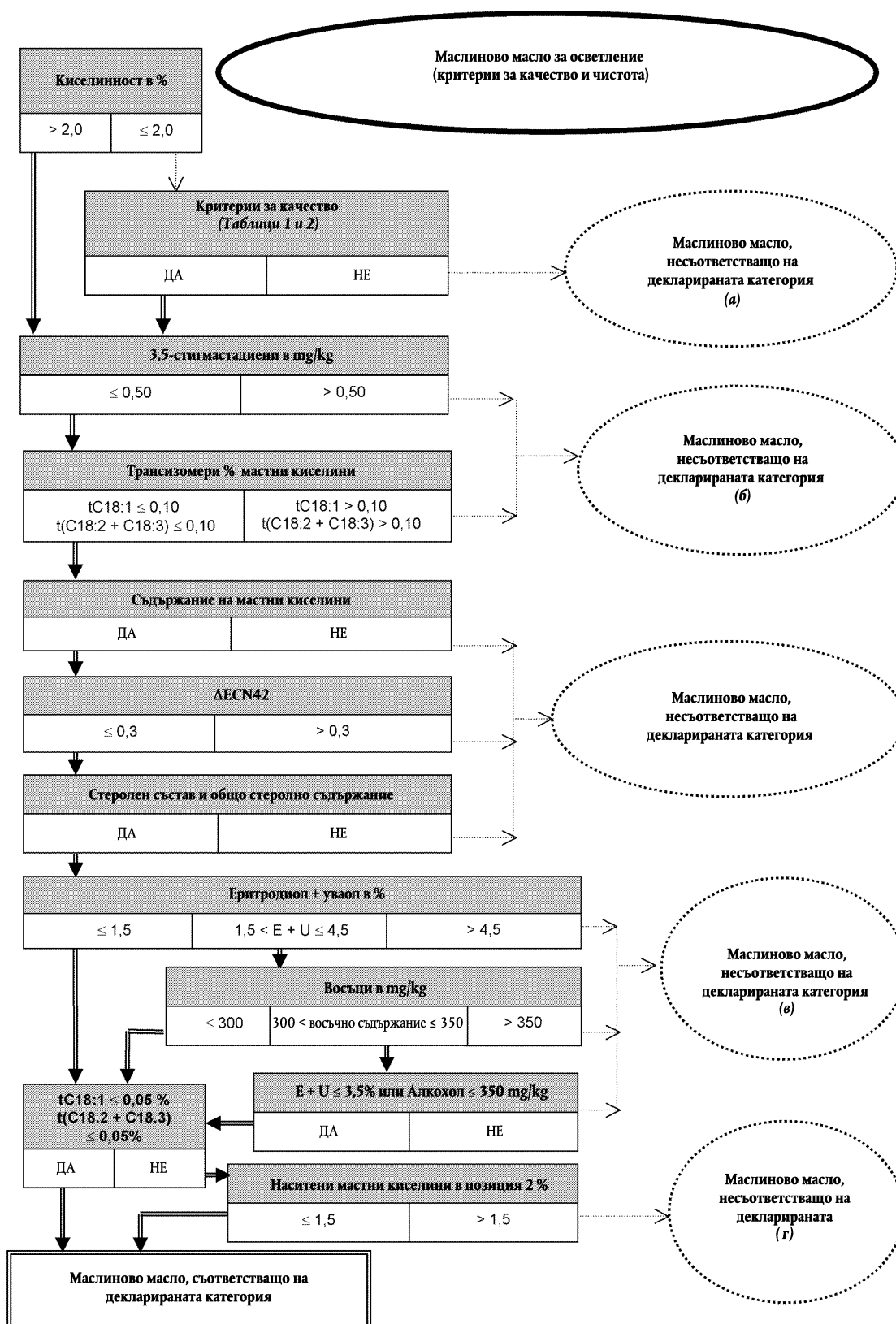
▼ M20

Таблица 3



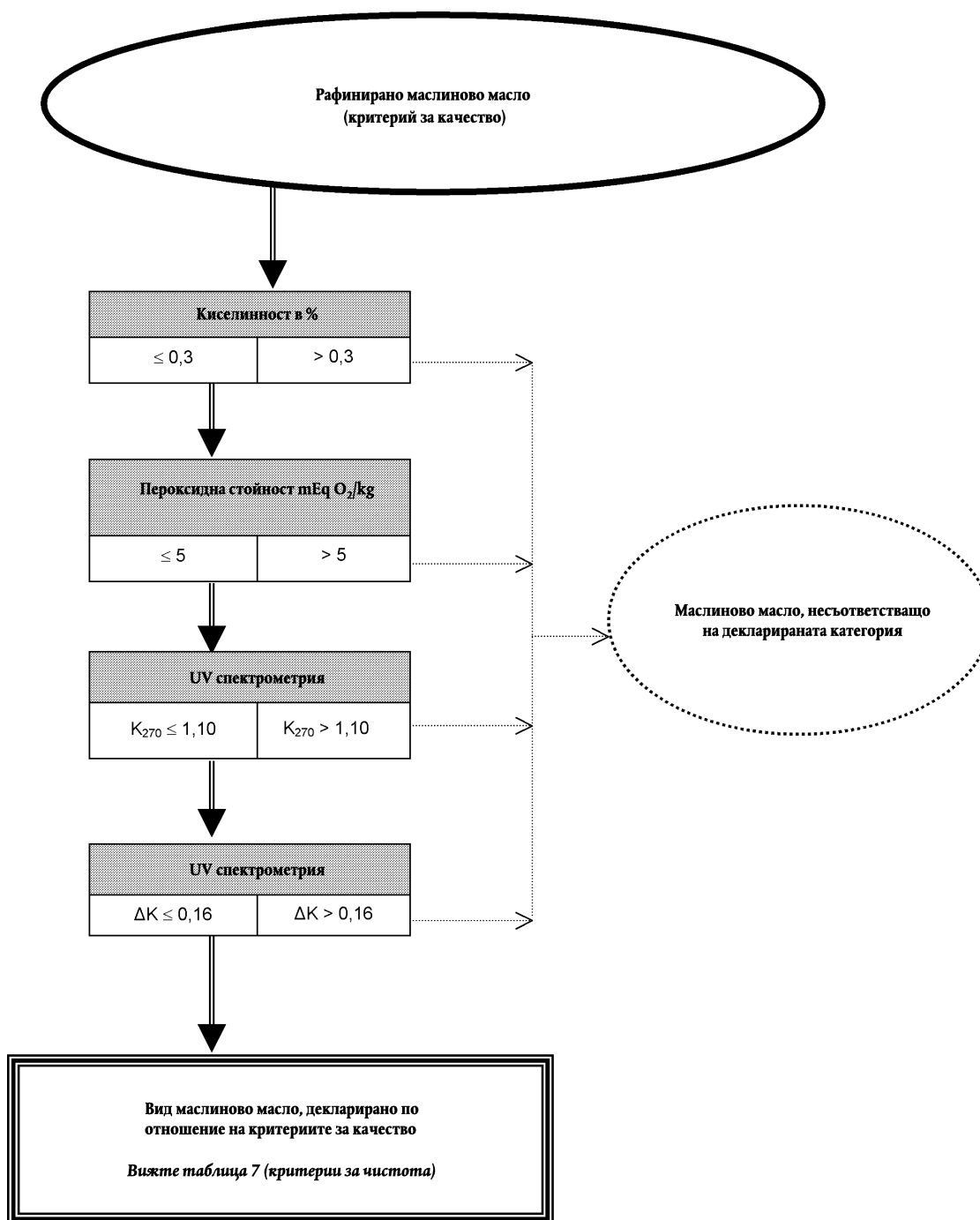
▼ M20

Таблица 4



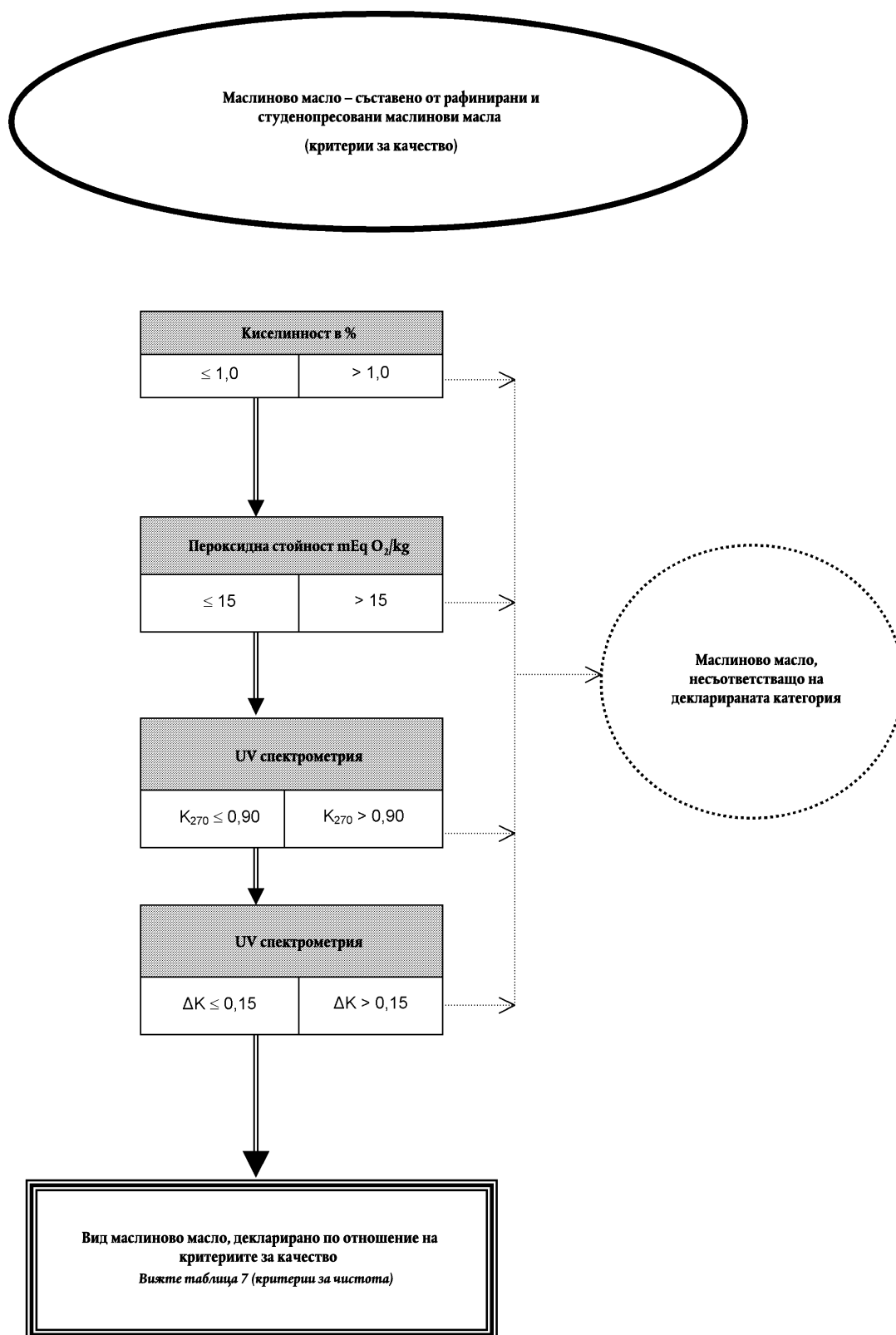
▼ M20

Таблица 5



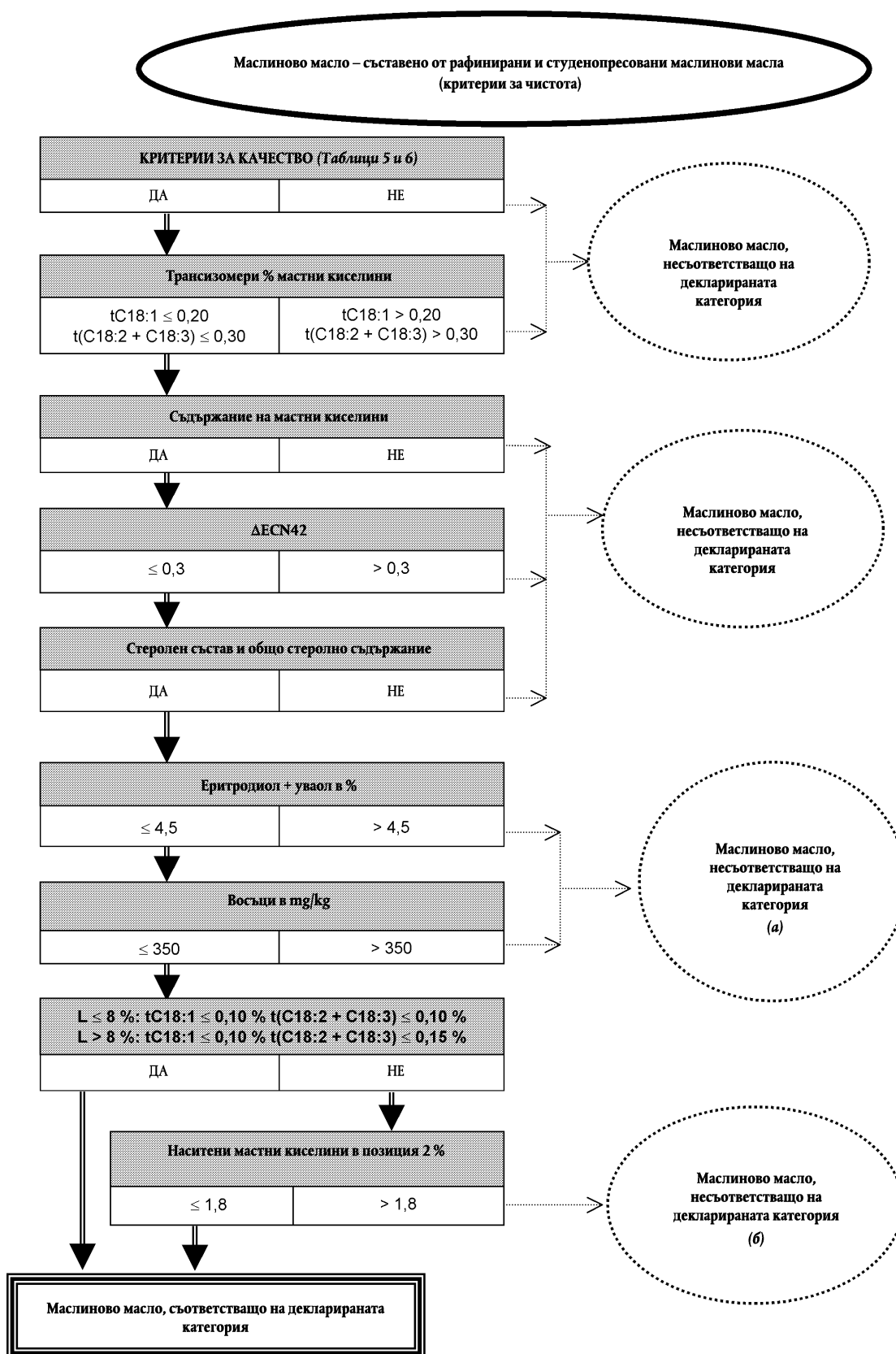
▼ M20

Таблица 6



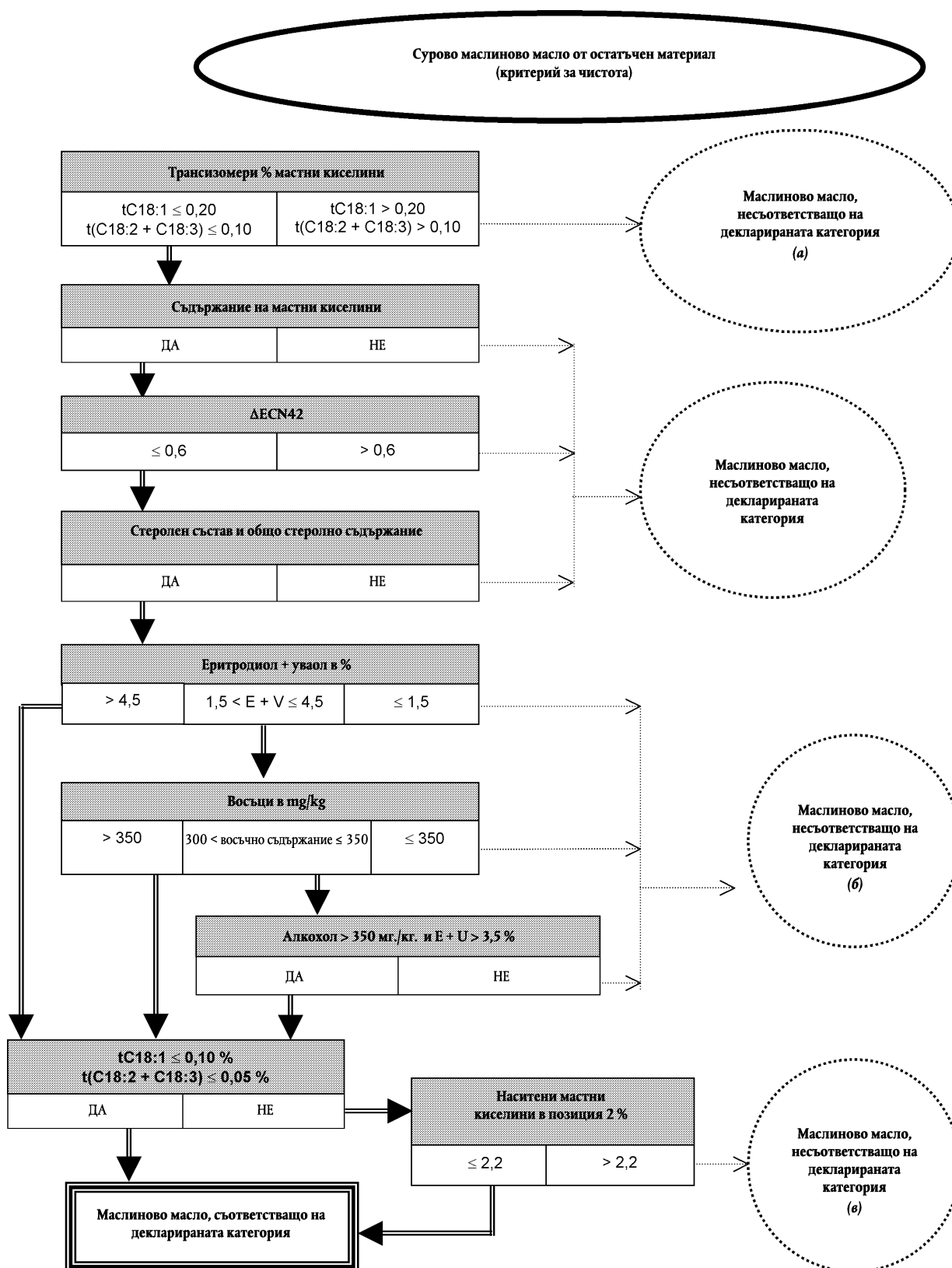
▼ M20

Таблица 7



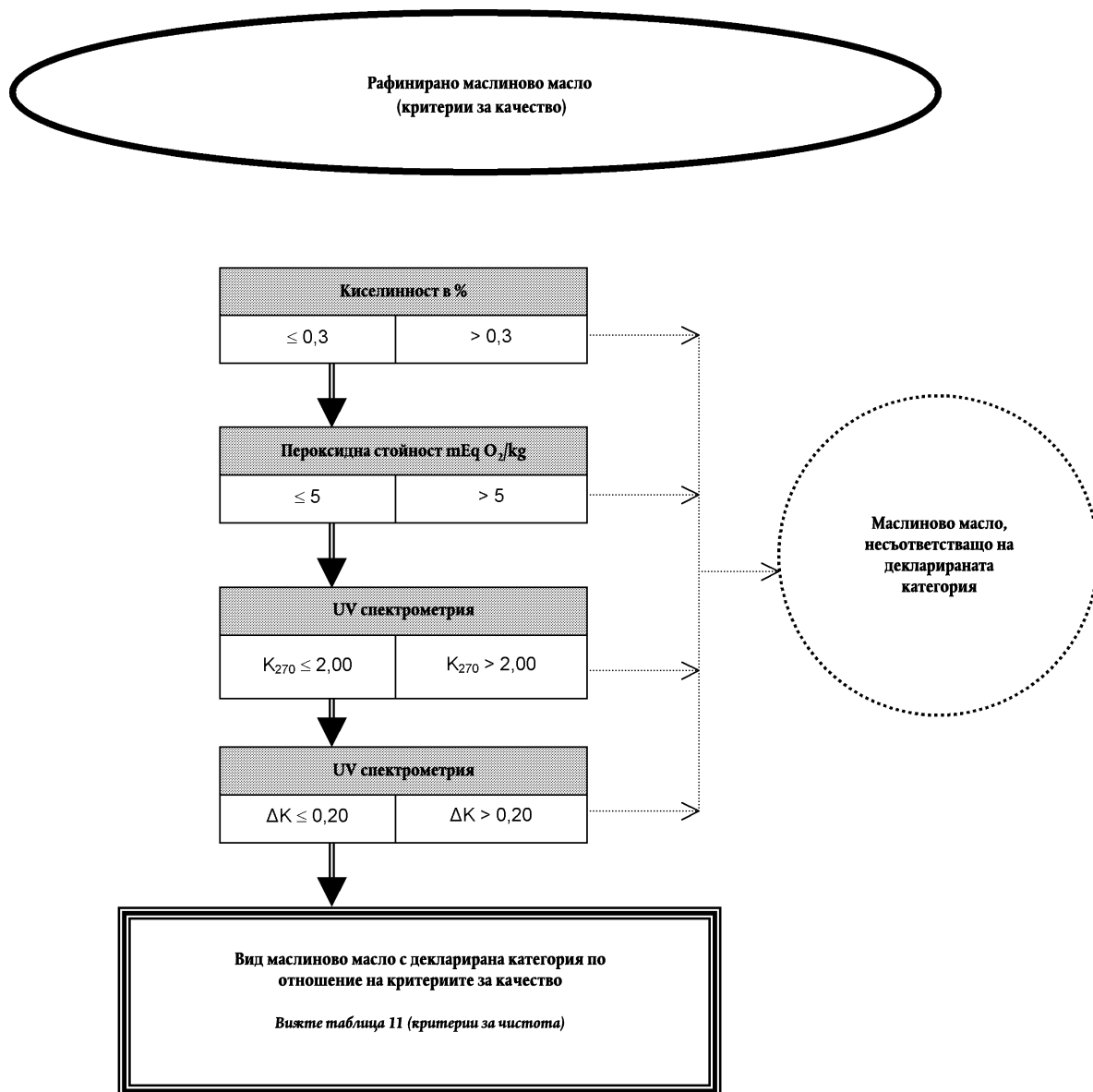
▼ M20

Таблица 8



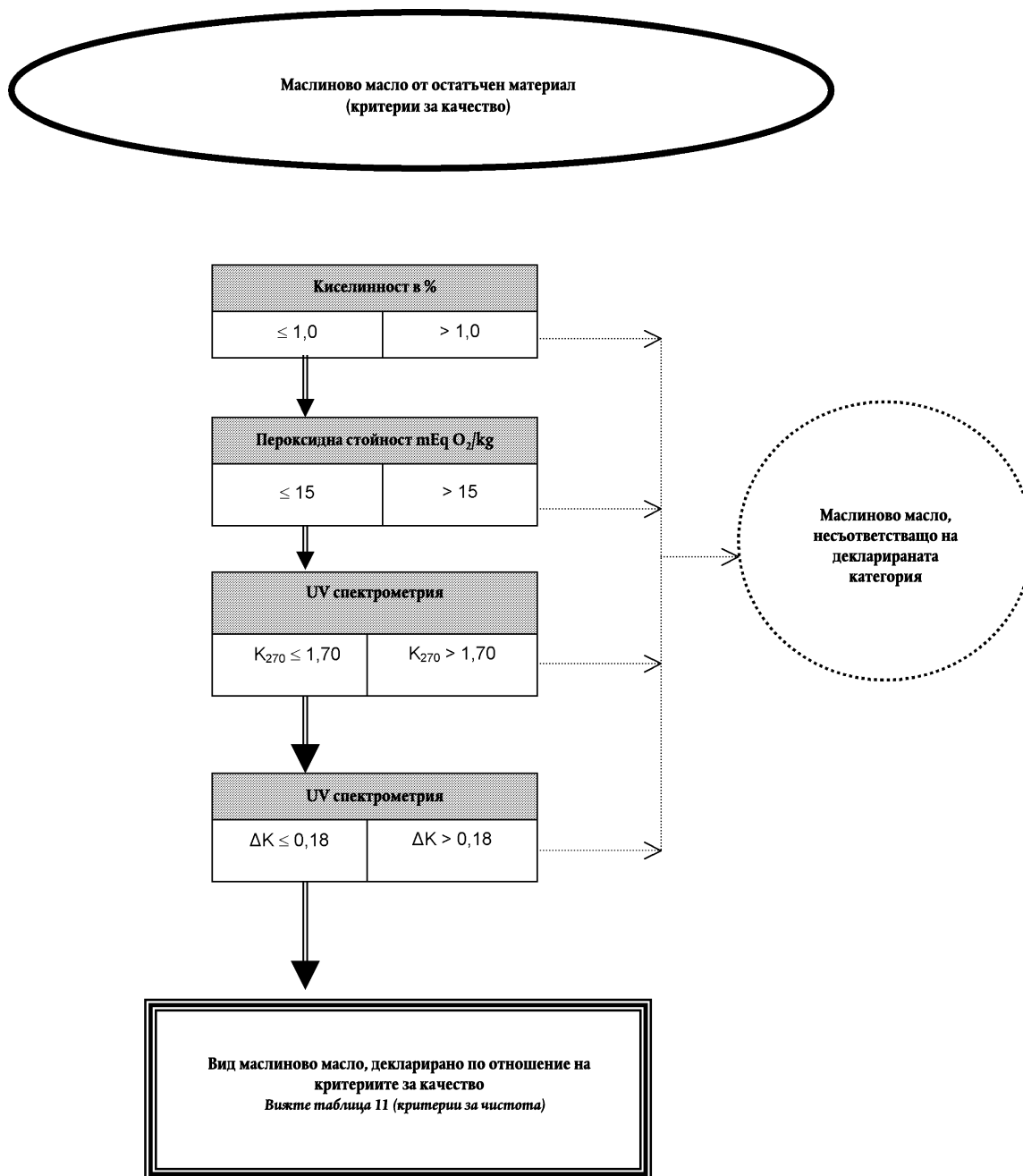
▼ M20

Таблица 9



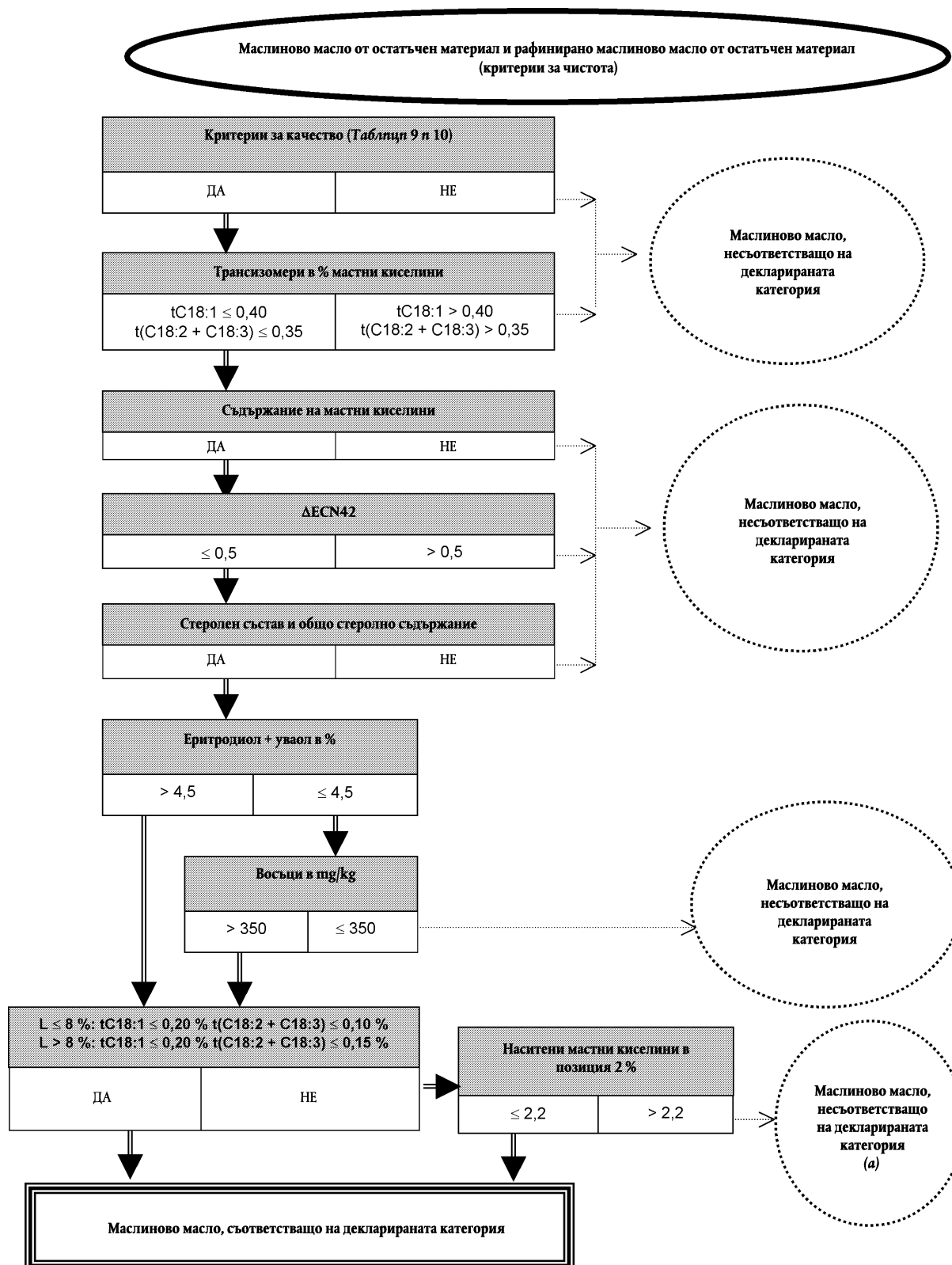
▼ **M20**

Таблица 10



▼ M20

Таблица 11



▼ **M20***Допълнение 1***Таблица на съответствието между приложенията към настоящия регламент и анализите, определени в схемата на решения**▼ **M21**

— Киселинност	Приложение II	Определяне на свободните мастни киселини, студен метод
---------------	---------------	--

▼ **M20**

— Пероксидно число	Приложение III	Определяне на пероксидното число
— Увспектметрия	Приложение IX	Спектрофотометричен анализ
— Органолептична оценка	Приложение XII	Органолептична оценка на студенопресован маслиново масло
— 3,5-стигмастидиени	Приложение XVII	Метод за определяне на стигмастидиените в растителните масла
— Трансизомери на мастните киселини	Приложение Ха и	Анализ на метиловите естери на мастните киселини чрез газова хроматография
	Приложение Хб	Подготовка на метиловите естери на мастните киселини
— Съдържание на мастните киселини	Приложение Ха и	Анализ на метиловите естери на мастните киселини чрез газова хроматография
	Приложение Хб	Подготовка на метиловите естери на мастните киселини
— ΔECN42	Приложение XVIII	Определяне на състава на триглицеридите с ECN42 (разлика между състава HPLC и теоритичния състав на триглицеридите)
— Стеролен състав и общо стеролно съдържание	Приложение V	Определяне на състава и съдържанието на стероли чрез капилярно-колонна газова хроматография
— Еритродиол и уваол	Приложение VI	Определяне на еритродиола и уваола
— Восьци	Приложение IV	Определяне на восьчното съдържание чрез капилярно-колонна газова хроматография
— Алифатични алкохоли	Приложение XIX	Определяне на съдържанието на алифатични алкохоли чрез капилярно-колонна газова хроматография

▼ **M21**

— Наситени мастни киселини в позиция 2	Приложение VII	Определяне на процентното съдържание на 2-глицерил монопалмитат
--	----------------	---

▼ M20*Допълнение 2***Таблица 1**

- а) Вижте неборазработено маслиново масло или маслиново масло за осветление (*Таблица 2* Критерии за качество или *Таблица 4* Критерии за качество и чистота)
- б) Вижте маслиново масло за осветление (*Таблица 4* Критерии за качество и чистота)

Таблица 2

- а) Вижте маслиново масло за осветление (*Таблица 4* Критерии за качество и чистота)
- б) Вижте двойнопресовано маслиново масло (*Таблица 1* Критерии за качество)

Таблица 3

- а) Наличие на рафинирано масло (маслиново или друго)
- б) Наличие на маслиново масло от остатъчен материал

Таблица 4

- а) Вижте двойнопресовано и необработено маслиново масло (*Таблица 1* и *Таблица 2* Критерии за качество)
- б) Наличие на рафинирано масло (маслиново или друго)
- в) Наличие на маслиново масло от остатъчен материал
- г) Наличие на естерифицирани масла

Таблица 7

- а) Наличие на маслиново масло от остатъчен материал
- б) Наличие на естерифицирани масла

Таблица 8

- а) Наличие на рафинирано масло (маслиново или друго)
- б) Вижте маслиново масло за осветление (*Таблица 4* Критерии за качество и чистота)
- в) Наличие на естерифицирани масла

Таблица 11

- а) Наличие на естерифицирани масла

▼ B

ПРИЛОЖЕНИЕ II

▼ M21

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СВОБОДНИТЕ МАСТНИ КИСЕЛИНИ, СТУДЕН МЕТОД

▼ B

1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КИСЕЛИННОСТТА

Определянето на свободните мастни киселини в маслиновото масло. Съдържанието на свободни мастни киселини се изразява като стандартно изчислена киселинност.

1.1. Принцип

Проба се разтваря в смес от разтворители и наличните свободни мастни киселини се титруват, като се използва етанолов разтвор на калиев хидроксид.

1.2. Реактиви

Всички реактиви трябва да са с признато качество за аналитични цели, а водата, която се използва, да е или дестилирана, или с еквивалентна чистота.

1.2.1. Диетилов етер; 95 % етанол (v/v), смес от равни обемни части.

Бележка: Диетиловият етер е лесно запалим и може да образува експлозивни пероксиди. Трябва да се работи със специално внимание при употребата му.

Неутрализира се точно в момента на употреба с разтвор на калиев хидроксид (1.2.2.), с добавка от 0,3 ml разтвор на фенолфталеин (1.2.3.) на 100 ml от сместа.

Бележка: Ако не е възможно да се използва диетилов етер, може да се използва смес от разтворители. Ако е необходимо, етанолът може да се замени с пропанол-2.

1.2.2. Калиев хидроксид, титриран етанолов разтвор, c(KOH) около 0,1 mol/l или, ако е необходимо, c(KOH) около 0,5 mol/l.

Точната концентрация на етаноловия разтвор на калиев хидроксид трябва да се знае и да се провери точно преди употреба. Използва се разтвор, приготвен поне пет дни преди употреба, декантиран в бутилка от кафяво стъкло с гумена запушалка. Разтворът трябва да е безцветен или със сламен цвят.

Бележка: Стабилизиран разтвор на калиев хидроксид може да се приготви по следния начин. Довеждат се до кипене 1 000 ml етанол с добавка на 8 g калиев хидроксид и 0,5 g алуминиеви стружки и кипенето се поддържа с обратен хладник за един час. Дестилира се веднага. Нужното количество калиев хидроксид се разтваря в дестилата. Остава се за няколко дни и се декантира чистата супернатантна течност от утайката от калиев карбонат.

Разтворът може също така да се приготви и без дестилация по следния начин: към 1 000 ml етанол се добавят 4 ml алуминиев бутилат и сместа се оставя за няколко дни. Декантира се супернатантната течност и се разтваря нужното количество калиев хидроксид. Разтворът е готов за употреба.

1.2.3. Фенолфталеин, разтвор от 10 g/l в 95 до 96 % етанол (v/v) или алкално синьо, (в случай че мазнините са силно оцветени) — разтвор от 20 g/l в 95 до 96 % етанол (v/v).

1.3. Апаратура

Обикновено лабораторно оборудване, включващо:

▼B

1.3.1. аналитична везна

1.3.2. 250-милилитрова ерленмайерова колба

1.2.3. 10-милилитрова бюрета, градуирана през 0,05 ml.

1.4. Ход на опыта

1.4.1. Подготвяне на пробата за изследване

(Опитът се провежда с филтрираната проба. В случай че водното съдържание и немаслените примеси, взети заедно, са по-малко от 1 %, пробата се използва без по-нататъшна обработка; в случай че те превишават 1 %, тя следва да се филтрира.)

1.4.2. Вземане на пробата

Пробата се взима в зависимост от очакваното киселинно число, в съответствие със следната таблица:

Очаквана киселинна стойност	Маса на пробата (g)	Точност на претегляне (g)
≤ 1	20	0,05
1 до 4	10	0,02
4 до 15	2,5	0,01
15 до 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Пробата се претегля в ерленмайеровата колба (1.3.2.).

1.4.3. Определяне

Пробата (1.4.2.) се разтваря в 50 до 150 ml от предварително неутрализираната смес от диетилов етер и етанол (1.2.1.).

Титрира се с разклащане с 0,1 mol/l разтвор на калиев хидроксид (1.2.2.) (виж бележка 2) до промяната на индикатора (розовото оцветяване на фенолфталеина се задържа за поне 10 секунди).

Бележка 1. Титрираният етанолов разтвор на калиев хидроксид (1.2.2.) може да се замени с воден разтвор на калиев или натриев хидроксид, като се предвиди обемът на добавената вода да не предизвика фазово разделяне.

Бележка 2. Ако количеството на необходимия 0,1 mol/l разтвор на калиев хидроксид превишава 10 ml, се използва 0,5 mol/l разтвор.

Бележка 3. Ако разтворът помътнее по време на титруването, се добавя достатъчно количество от разтворителите (1.2.1.) до получаването на бистър разтвор.

1.5. Киселинност: изразена като процентно съдържание на олеинова киселина

Киселинността в проценти е равна на:

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

▼ B

където:

V = обемът на използвания титриран разтвор на калиев хидроксид, в милиметри;

c = точната концентрация от използвания титриран разтвор на калиев хидроксид, в молове на литър;

M = моларното тегло на мол от киселината, използвана за изразяване на резултата (= 282), в грамове;

m = теглото на пробата, в грамове.

Като резултат се приема средната аритметична стойност ► **M6** от две калкулации ◄.



ПРИЛОЖЕНИЕ III

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПЕРОКИСНОТО ЧИСЛО

1. ОБХВАТ

Стандартът описва метод за определянето на перокисното число на маслата и мазнините.

2. ПРИЛОЖНО ПОЛЕ

Стандартът е приложим за животински и растителни масла и мазнини.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Перокисното число е количеството на тези вещества в пробата, изразени в милиеквиваленти активен кислород на килограм, които окисляват калиевия йодид, съгласно описаната опитна постановка.

4. ПРИНЦИП

Обработка на част от пробата в разтвор на оцетна киселина и хлороформ с разтвор на калиев йодид.

5. АПАРАТУРА

Цялото оборудване трябва да е свободно от редуциращи или оксидиращи вещества.

Бележка: Не бива да се омазняват стените.

5.1. 3-милилитрова стъклена лопатка.

5.2. Колби с шлифовани гърла и запушалки с вместимост от около 250 ml, предварително изсушени и запълнени с чист сух инертен газ (азот или за предпочитане въглероден диоксид).

5.3. 25- или 30-милилитрова бюрета, градуирана през 0,1 ml.

6. РЕАКТИВИ

6.1. Хлороформ, с качество за аналитични цели, освободен от кислород чрез прокаряване на поток от чист сух инертен газ през него.

6.2. Ледена оцетна киселина, с качество за аналитични цели, освободена от кислород чрез прокаряване на поток от чист сух инертен газ през нея.

6.3. Калиев йодид, наситен воден разтвор, прясно приготвен, свободен от йод и йодати.

6.4. Натриев тиосульфат, 0,01 или 0,002 Mol/L, прецизно стандартизиран воден разтвор, стандартизиран точно преди употребата.

6.5. Разтвор на скорбяла, 10 g/l водна дисперсия, прясно приготвена от естествено разтворима скорбяла.

7. ПРОБА

Пробата следва да се вземе и съхранява без достъп на светлина, на студено и да се съхранява в изцяло запълнени стъклени контейнери, херметично запечатани със запушалки от шлифовано стъкло или корк.

▼B**8. ХОД НА ОПИТА**

Опитът се провежда при разсеяна светлина или при изкуствено осветление. Измерва се в стъклена лопатка (5.1.) или, ако това е невъзможно, в колба (5.2.), с точност до 0,001 g, маса от пробата в съответствие със следната таблица, съгласно очакваното перокисно число:

Очаквано перокисно число (meq)	Тегло на част от пробата (g)
0 до 12	5,0 до 2,0
12 до 20	2,0 до 1,2
20 до 30	1,2 до 0,8
30 до 50	0,8 до 0,5
50 до 90	0,5 до 0,3

Отпушва се колбата (5.2.) и се поставя стъклената лъжичка, съдържаща частта от пробата. Прибавят се 10 ml хлороформ (6.1.). Разтваря се частта от пробата чрез бързо разбъркване. Добавят се 15 ml оцетна киселина (6.2.) и след това — 1 ml разтвор на калиев йодид (6.3.). Поставя се бързо запушалката, разклаща се в продължение на една минута и се оставя в покой за точно пет минути, без достъп на светлина, при температура от 15 до 25 °C.

Прибавя се около 75 ml дестилирана вода. Титрира се освободеният йод с разтвор на натриев тиосульфат (6.4.) (0,002 Mol/L разтвор за очаквани стойности по-малки от 12 и 0,01 Mol/L разтвор за очаквани стойности над 12), като се разклаща енергично при използването на разтвор на скорбяла като индикатор.

Провеждат се две определяния на същата опитна проба.

Провежда се едновременно контролен опит. Ако резултатът от контролния опит превишава 0,05 ml от 0,01 Mol/L разтвор на натриев тиосульфат (6.4.) нечистите реактиви се подменят.

9. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Перокисното число (ПЧ), изразено в милиеквиваленти активен кислород на килограм, е представено чрез формулата:

$$\text{ПЧ} = \frac{V \times T \times 1000}{m},$$

където:

V = броят милилитри от стандартизирания разтвор на натриев тиосульфат (6.4.), използван за опита, коригиран, след като се вземат предвид резултатите от контролния опит;

T = точната молярност на използвания разтвор на натриев тиосульфат (6.4.);

m = масата на частта от пробата, в грамове.

За резултат се приема средната аритметична стойност от две проведени определяния.

▼ **M21***ПРИЛОЖЕНИЕ IV***ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ПАРАФИНИ ЧРЕЗ КАПИЛЯРНА ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ****1. ПРЕДМЕТ**

Този метод описва способ за определяне на съдържанието на парафини в маслиново масло. Парафините се анализират съобразно броя въглеродни атоми. Методът може да се използва по-специално за диференциране на маслиновото масло, получено чрез пресоване, от това, което е получено чрез екстракция (маслиново масло от остатъчен материал).

2. ПРИНЦИП

Мастното вещество, към което е добавен подходящ вътрешен стандарт, се фракционира чрез хроматография върху колонка от хидратиран силикагел; сменя се фракцията, която първа се елуира в опитните условия (при полярност, по-ниска от тази на триглицеридите), след което се анализира директно чрез капиларна газова хроматография.

3. ОБОРУДВАНЕ

- 3.1. Ерленмайерова колба от 25 ml.
- 3.2. Стъклена колонка за газова хроматография с вътрешен диаметър 15 mm, височина 30 до 40 cm, оборудвана с кранче.
- 3.3. Апарат за газова хроматография, приспособен за функциониране с капиларна колонка, оборудван със система за директно въвеждане в колонката, състояща се от:
 - 3.3.1. Термостатна камера за колонките, оборудвана с температурен програматор.
 - 3.3.2. Инжектор за студено пускане — за директно вкарване в колонката.
 - 3.3.3. Пламъчно-йонизационен детектор и усилвателен преобразувател.
 - 3.3.4. Записващ интегратор, пригоден за работа с усилвателен преобразувател (3.3.3), с време на отговор под 1 секунда и променлива скорост на подаване на хартията. (Възможна е да се използват и информационни системи, които позволяват компютризирано събиране на данните от газовата хроматография.)
 - 3.3.5. Капиларна колонка от стъкло или кварц, с дължина от 8 до 12 m, вътрешен диаметър от 0,25 до 0,32 mm, покрита отвътре със стационарна фаза, с еднородна дебелина между 0,10 и 0,30 μm . (Стационарни фази от тип SE-52 или SE-54, годни за употреба, се намират в търговската мрежа.)
- 3.4. Микроспринцовка с вместимост 10 μl , за директно подаване в колонката, снабдена със закалена игла.
- 3.5. Електровибратор.
- 3.6. Ротационен изпарител.
- 3.7. Муфелна пещ.
- 3.8. Аналитични везни, гарантиращи точност на измерване до $\pm 0,1$ mg.
- 3.9. Обикновена лабораторна стъклария.
4. РЕАКТИВИ
- 4.1. Силикагел с гранулометричен състав между 60 и 200 μm .

Силикагелът трябва да престои в пещ при 500 °C в продължение на минимум 4 часа. След охлаждане добавете към него вода, равна на 2 % от снетото количество силикагел. Разбъркайте добре, за да хомогенизирате сместа. Оставете я на тъмно в продължение на минимум 12 часа преди употреба.

▼ **M21**

- 4.2. n-хексан за хроматография.
- 4.3. Етилов етер за хроматография.
- 4.4. n-хептан за хроматография.
- 4.5. Стандартен разтвор на лауринов арахидат — 0,1 % (m/v) в хексан (вътрешен стандарт). (Възможно е да се използва и цетилов палмитат или миристилов стеарат.)
 - 4.5.1. *Судан 1 (1-фенил-азо-2-нафтол).*
- 4.6. Газ носител: чист водород или хелий, за газова хроматография.
- 4.7. Спомагателни газове:
 - чист водород за газова хроматография;
 - чист въздух за газова хроматография.

5. РАБОТЕН РЕЖИМ

5.1. **Подготовка на хроматографската колонка**

Потопете 15 g силикагел (4.1) в n-хексан (4.2) и го поставете в колонката (3.2). Компенсирайте бързата седиментация с помощта на електрическа бъркалка (3.5), за да направите хроматографския пласт по-хомогенен. Перколирайте 30 ml n-хексан, за да отстраните евентуалните примеси. Претеглете с помощта на везните (3.8) точно 500 mg от пробата в ерленмайеровата колба с вместимост 25 ml (3.1), добавете нужното количество вътрешен стандарт (4.5), в зависимост от предполагаемото съдържание на парафини. Например, когато се касае за маслиново масло, добавете 0,1 mg лауринов арахидат, а когато става въпрос за маслиново масло от остатъчен материал — 0,25 до 0,5 mg. Прехвърлете така приготвената проба в хроматографската колонка с помощта на две дози n-хексан, всяка по 2 ml (4.2).

Оставете разтворителя да изтече, така че да достигне на 1 mm от горното ниво на абсорбента, след което перколирайте допълнително 70 ml n-хексан, за да отстраните естествено наличните n-алкани. После започнете хроматографското елуиране, събирайки 180 ml от сместа n-хексан/етилов етер, в съотношение 99:1, като поддържате дебит от около 15 капки на 10 секунди. Елуирането на пробата трябва да се извърши при стайна температура 22 ± 4 °C.

Бележки: — Сместа n-хексан/етилов етер (99:1) трябва да се приготвя всеки ден.

- За да контролирате визуално правилното елуиране на парафините, възможно е да добавите към разтворената проба 100 µl судан (1 %) в елуираната смес. Тъй като оцветителят е с междинно време на задържане спрямо парафините и триглицеридите, уместно е елуирането да се прекрати тогава, когато оцветяването достигне дъното на хроматографската колонка, тъй като на този етап всички парафини са елуирани.

Изсушете така получената фракция в ротационен изпарител (3.6) до практически пълното отстраняване на разтворителя. Последните 2 ml от разтворителя се отстраняват с помощта на слаб азотен поток; след това добавете 2-4 ml n-хептан.

5.2. **Анализ чрез газова хроматография**5.2.1. *Предварителни операции*

Поставете колонката в газовия хроматограф (3.3), свързвайки входния извод към системата on-column, а изходния — към детектора. Извършете основните проверки на апаратурата за газова хроматография (здравина на газовите контури, ефективност на детектора и на записващата система и т. н.).

▼ M21

Ако колонката се използва за първи път, се препоръчва да пристъпите към кондиционирането ѝ. Прокарайте през колонката малко газ, след което включете апаратурата за газова хроматография. Нагрейте постепенно до достигане, след около 4 часа, на температура 350 °C. Поддържайте тази температура в продължение на минимум 2 часа, след което пристъпете към настройката на апаратурата към условията на работа (настройка на газовия поток, запалване на пламъка, включване към електронното записващо устройство (3.3.4), настройка на температурата на камерата за колонката, на детектора и т. н.) и настройте сигнала на чувствителност поне 2 пъти по-висока от предвидената за провеждане на анализа. Ходът на основната линия трябва да бъде линеен, без пикове от каквото и да е естество, и не трябва да показва отклонения.

Отрицателното праволинейно отклонение е показател за неизправни връзки на колонката; положителното отклонение е показател за недостатъчно кондициониране на колонката.

5.2.2. Избор на работните условия

Общо взето, работните условия, които следва да се спазват, са следните:

— температура на колонката:

	20 °C/ минута		5 °C/ минута		20 °C/ минута	
в началото 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10'),

— температура на детектора: 350 °C,

— количество инжектирано вещество: 1 µl от разтвора (2—4 ml) n-хептан,

— газ носител: хелий или водород с оптимална линейна скорост за съответния газ (виж допълнението),

— инструментална чувствителност: в състояние да удовлетвори посочените по-долу условия:

Тези условия могат да варират в зависимост от характеристиките на колонката и на газовия хроматограф по такъв начин, че да се постигне анализиране на всички парафини, задоволителна разделителна способност на пиковите (виж фигурата); времето на задържане на вътрешния стандарт C₃₂ следва да бъде 18 ± 3 минути. Най-изразеният пик на парафините следва да се намира на минимум 60 % височина от основата на скалата.

Параметрите на интегриране на пиковите следва да се определят по начин, който позволява правилно изчисление на лицата на пиковите, взети под внимание.

Бележка. Като се има предвид високата крайна температура, се допуска положително отклонение, което не бива да надвишава 10 % височина от основата на скалата.

5.3. Провеждане на анализа

С помощта на микроспринцовка с вместимост 10 µl вземете 1 µl от разтвора; издърпайте буталото на спринцовката, така че иглата да остане празна. Вкарайте иглата в инжекционния прибор и след 1—2 секунди бързо инжектирайте разтвора; след около 5 секунди бавно извадете иглата.

Проведете запис на анализа до пълното елуиране на парафините.

▼ **M21**

Основната линия следва винаги да отговаря на необходимите условия.

5.4. **Идентифициране на пиковете**

Идентифицирането на различните пикове следва да се извършва въз основа на времената на задържане и в сравнение със смеси от парафини с познати времена на задържане, анализирани при същите условия.

Фигурата представя хроматограма на парафините в необработено маслиново масло.

5.5. **Количествено изчисление**

С помощта на интегратора пристъпете към изчислението на лицата на пиковете на вътрешния стандарт и на алифатните естери от C₄₀ до C₄₆.

Изчислете съдържанието на парафин във всеки един от естерите, в mg/kg масно вещество, по формулата:

$$\text{естер, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m},$$

където:

A_x = лице на пика на всеки естер, в квадратни милиметри;

A_s = лице на пика на вътрешния стандарт, в квадратни милиметри;

m_s = добавена маса на вътрешния стандарт, в милиграми;

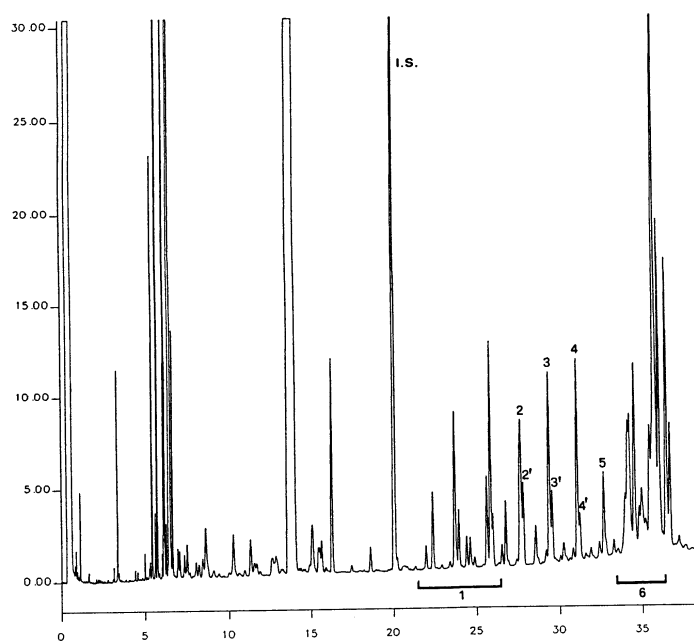
m = маса на пробата, взета за анализ, в грамове.

6. **ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

Отбележете сумата на съдържанията на отделните парафини от C₄₀ до C₄₆, в mg/kg масно вещество (ppm).

Забележка. Компонентите, които трябва да се определят, се отнасят до пиковете с четно въглеродно число между естерите C₄₀ и C₄₆, съгласно примера на хроматограмата на парафините в маслиновото масло, посочена на фигурата по-долу. Ако естерът C₄₆ се появи двойно, се препоръчва за идентифицирането му да се анализира фракцията на парафините в маслиново масло от остатъчен материал, където пикът C₄₆ се идентифицира лесно, тъй като е най-изразеният.

Резултатите се дават с точност до една десета.

▼ **M21***Фигура***Хроматограма на парафините в маслиново масло ⁽¹⁾***Легенда:*

- I.S. = лауринов арахидат;
 1 = дитерпенови естери;
 2 + 2' = естери C₄₀;
 3 + 3' = естери C₄₂;
 4 + 4' = естери C₄₄;
 5 = естери C₄₆;
 6 = стеролови естери и тритерпенови алкохоли.

⁽¹⁾ След елуирането на стероловите естери хроматографският ход не бива да съдържа изразени пикове (триглицериди).

▼ M21*Допълнение***Определяне на линейната скорост на газа**

Инжектирайте от 1 до 3 μl метан (или пропан) в газовия хроматограф след настройката му към нормални условия на работа. Засечете с хронометър времето, необходимо на газа да премине през колонката, от момента на инжектирането му до момента, в който пикът се очертае (t_M).

Линейната скорост, в cm/s , се изчислява по формулата L/t_M , където L е дължината на колонката в сантиметри, а t_M е засеченото време в секунди.



ПРИЛОЖЕНИЕ V

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪСТАВА И СЪДЪРЖАНИЕТО НА СТЕРОЛИ ЧРЕЗ КАПИЛЯРНОКОЛОНКОВА ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ

1. ОБХВАТ

Методът описва процедура за определяне на отделното количество и общото количество на съдържанието на стероли в масните вещества.

2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Масното вещество, след добавянето на β -холестанол като вътрешен стандарт, се осажува с етанолов разтвор на калиев хидроксид и неосажуемите съставки се екстрахират с помощта на диетилов етер.

Стероловата фракция се отделя от неосажуемия екстракт чрез хроматография на основна плака със силикагел. Стеролите, възстановени от силикагела, се преобразуват в триметилсилил етери и се анализират чрез капилярно-колонкова газова хроматография.

3. АПАРАТУРА

- 3.1. 250 ml колба с обратен хладник със снадки от шлифовано стъкло.
- 3.2. Разделителни фунии с вместимост от 500 ml.
- 3.3. Колби с вместимост от 250 ml.
- 3.4. Пълен набор за тънкослоен хроматографски анализ, с използване на стъклени плаки с размери 20 × 20 cm.
- 3.5. Ултравioletова лампа с дължина на вълната 366 до 254 nm.
- 3.6. Микроспринцовки с вместимост съответно 100 μ l и 500 μ l.
- 3.7. Цилиндрична стъклена филтрационна фуния с порьозна преграда G3 (порьозност 15 до 40 μ) с диаметър приблизително 2 cm и височина приблизително 5 cm, подходяща за филтриране под вакуум и шлифована мъжка снадка 12/21.
- 3.8. Вакуумна колба с вместимост 50 ml с шлифована женска снадка 12/21 за свързване с филтрационната фуния (3.7.).
- 3.9. Епруветка с вместимост 10 ml с конично дъно и тапа.
- 3.10. Газов хроматограф за използване с капилярна колонка и снабден с разделителна система, състояща се от:
 - 3.10.1. термостатична камера за колонки с възможност за поддържане на желаната температура с точност до ± 1 °C;
 - 3.10.2. изпарителен агрегат с възможност за настройка на температурата с изпарителен елемент от персиланизирано стъкло;
 - 3.10.3. детектор за пламъчна йонизация и усилвателен преобразувател;
 - 3.10.4. записващ интегратор за използване с усилвателния преобразувател (3.10.3.), с време на отговор, което не превишава една секунда, и променлива скорост на подаване на хартията.
- 3.11. Стъклена или кварцова капилярна колонка с дължина 20 до 30 m, вътрешен диаметър 0,25 до 0,32 mm, с течна фаза с SE-52 или SE-54 или еквивалентна, с плътност на слоя между 0,10 и 0,30 μ m.
- 3.12. Микроспринцовка за газова хроматография, с вместимост 10 μ l със закалена игла.

▼ **B**

4. РЕАКТИВИ

- 4.1. Приблизително 2 mol/L етанолов разтвор на калиев хидроксид. Разтварят се 130 g калиев хидроксид (минимална концентрация 85 %), с охлаждане, в 200 ml дестилирана вода и се долива до един литър с етанол. Разтворът трябва да се съхранява в добре затворени стъклени бутилки с тъмен цвят.
- 4.2. Диетилов етер, пречистен за аналитични цели.
- 4.3. Безводен натриев сулфат, пречистен за аналитични цели
- 4.4. Стъклени плаки, обвити със силикагел, без флуоресцентен индикатор, с дебелина 0,25 mm (могат да се доставят от търговската мрежа).
- 4.5. 0,2 mol/L етанолов разтвор на калиев хидроксид: 13 g калиев хидроксид се разтварят в 20 ml дестилирана вода и се доливат до един литър с етанол.
- 4.6. Бензен, за хроматография. (Виж 5.2.2.).
- 4.7. Ацетон, за хроматография, (Виж 5.2.2.).
- 4.8. Хексан, за хроматография. (Виж 5.2.2.).
- 4.9. Диетилов етер, за хроматография. (Виж 5.2.2.).
- 4.10. Хлороформ, пречистен за аналитични цели. (Виж 5.2.2.).
- 4.11. Стандартен разтвор за тънкослойна хроматография: ► **M6** 2 % ◀ разтвор в хлороформ на холестерол или фитостероли.
- 4.12. 0,2 % разтвор на 2,7-дихлорофлуоресцин в етанол. Той се алкализирa слабо чрез добавяне на няколко капки 2 mol/L алкохолен разтвор на калиев хидроксид.
- 4.13. Безводен пиридин, за хроматография.
- 4.14. Хексаметилдисилазан.
- 4.15. Триметилхлоросилан.
- 4.16. Стандартни разтвори на триметилсилил етери. Те се приготвят в момента на употреба от чисти стероли или смеси от стероли, получени от масла, които ги съдържат.
- 4.17. 0,2 % разтвор (m/V) на β -холестанол в хлороформ (вътрешен стандарт).
- 4.18. Газове носители: водород и хелий, пречистени за газова хроматография.
- 4.19. Спомагателни газове:
 - водород, пречистен за газова хроматография;
 - въздух, пречистен за газова хроматография.

5. ХОД НА ОПИТА

5.1. Приготвяне на неосапняемите съставки.

- 5.1.1. С помощта на спринцовка с вместимост 500 μ l се поставя в 250-милилитрова колба обем 0,2 % разтвор на α -холестанол в хлороформ (4.17.), съдържащ такова количество холестерол, което съответства на приблизително 10 % от стероловото съдържание на аликвотната част от пробата, взета за определяне. Например за 5 g от пробата се добавят 500 μ l от 0,2 % разтвор на α -холестанол, когато става въпрос за маслиново масло и 1 500 μ l — за масло от маслиново кюспе.

Изсушава се до сухо с поток от азот и тогава се измерва прецизно 5 g от сухата филтрирана проба в същата колба.

▼ B

► **M6** Масла ◀, съдържащи значителни количества холестерол могат да покажат пик, имащ време на задържане, идентичен с този на холестанола. Ако това се прояви, стероловата фракция следва да се анализира двукратно със и без вътрешен стандарт ► **M6** или е необходимо да се използва бетулинол вместо холестанол ◀.

5.1.2. Добавят се 50 ml 2 mol/L етанолов разтвор на калиев хидроксид, поставя се обратният хладник и се подгрява до слабо кипене на водна баня с непрекъснато силно разбъркване, докато се извърши осапуняването (разтворът се избистря). Нагряването се продължава за още 20 минути, след което се прибавят 50 ml дестилирана вода до върха на хладника, хладникът се отстранява, а колбата се охлажда до приблизително 30 °C.

5.1.3. Съдържанието на колбата се прехвърля количествено в 500 ml разделителна фуния с помощта на няколко промивки с дестилирана вода, възлизаща общо на около 50 ml. Прибавят се приблизително 80 ml диетилов етер, разклаща се енергично в продължение на около 30 секунди и се оставя да се утаи (бележка 1).

Отделя се долната водна фаза, като тя се събира в отделна разделителна фуния. Извършват се две по-нататъшни екстракции на водната фаза по същия начин, като всеки път се използват 60 до 70 ml етилов етер.

Бележка 1: Която и да е емулсия може да се раздели чрез прибавянето на малки количества етилов или метилов алкохол с помощта на опръскване.

5.1.4. Изтеглят се етерните екстракти в отделна разделителна фуния и се промиват в дестилирана вода (50 ml всеки път), докато промивната вода не даде неутрална реакция.

След като промивната вода е била отстранена, се изсушава с безводен натриев сулфат и се филтрира през безводен натриев сулфат в предварително претеглена 250-милилитрова колба, като фунията и филтърът се промиват с малки количества диетилов етер.

5.1.5. Етерът се дестилира до няколко милилитра, след това се изсушава под лек вакуум или под поток от азот, като изсушаването се довършва в пещ при 100 °C за приблизително четвърт час и след охлаждане в десикатор се претегля.

5.2. Отделяне на стероловата фракция.

5.2.1. Подготовка на основните плаки. Плаки със силикагел (4.4.) се потапят напълно в 0,2 mol/L етанолов разтвор на калиев хидроксид (4.5.) за 10 секунди, след което се оставят да изсъхнат в изпарителен шкаф за два часа и накрая се поставят в пещ при 100 °C за един час.

Изваждат се от пещта и се съхраняват в десикатор с калциев хлорид до използването им (така обработените плаки трябва да се използват в рамките на 15 дни).

Бележка 2: Когато се използват плаки със силикагел за отделяне на стероловата фракция, няма нужда да се обработват неосапуняемите съставки с диалуминиев триоксид. По този начин всички съединения с киселинни свойства (мастни киселини и други) се задържат в точката на напаване и стероловата ивица ясно се отделя от ивиците на алифатните или тритерпеновите алкохоли.

▼B

- 5.2.2. В проявителната камера се налива до дълбочина около 1 cm смес от бензен и ацетон в съотношение 95:5 (v/v). Като алтернатива може да се използва смес от хексан и етилов етер в съотношение 65:35 (v/v). Камерата се затваря с подходящ капак и се оставя така за около половин час, така че да се установи равновесие между течността и парите. Към вътрешните повърхности на камерата могат да се прикрепят ивици от филтърна хартия, потопени в отмивния агент. Това намалява времето за проявяване с приблизително една трета и се постига по-равномерно, правилно отмиване на съставките.

Бележка 3: Проявителният разтвор трябва да се подменя преди всеки анализ, с оглед на получаването на възпроизводими условия за проявяване.

- 5.2.3. Подготвя се приблизително 5 % разтвор на неосапуяеми съставки (5.1.5.) в хлороформ и 300 µl от разтвора се нанася на възможно най-тънка равномерна ивица с помощта на микроспринцовката с вместимост 100 µl на плака за хроматография на приблизително 2 cm от единия край на плаката. На същото равнище като ивицата се на капват 2 до 3 µl от стандартния разтвор (4.11.) за разпознаването на ивицата от алифатни алкохоли след завършването на проявяването.
- 5.2.4. Плаката се поставя в проявителната камера както е указано в 5.2.2. Температурата се поддържа между 15 и 20 °C. Камерата се затваря с капачка веднага и пробата се оставя за отмиване, докато фронтът на разтворителя достигне на разстояние 1 cm от горния край на плаката. След това плаката се изважда от проявителната камера и разтворителят се изпарява под горещ въздушен поток или плаката се оставя под камината.
- 5.2.5. Плаката се напръсква леко и равномерно с разтвора на 2,7-дихлорофлуоресцин. Когато плаката се наблюдава под ултравиолетова светлина, ивицата от стероли може да се разпознае като се обедини с петното, получено от стандартния разтвор. Границите на ивицата по краищата на флуоресценцията се очертават с черен молив.
- 5.2.6. Силикагелът, включен в тази определена област, се изчегъртва с метална шпатула. Отделеният надробен материал от силикагел се поставя във филтърната фуния (3.7.). Прибавят се 10 ml горещ хлороформ, разбърква се добре с металната шпатула и се филтрира под вакуум, като филтратът се събира в колбата (3.8.), която е свързана с филтърната фуния.

Утайката от фунията се промива три пъти с диетилов етер (с около 10 ml всеки път), като филтратът се събира в същата колба, свързана с филтърната фуния. Филтратът се изпарява до обем от 4 до 5 ml и остатъчният разтвор се прехвърля в епруветка с вместимост 10 ml (3.9.), която е била претеглена предварително; изпарява се до сухо чрез леко подгряване под азотен поток, утайката се разтваря отново с няколко капки ацетон, отново се изпарява до сухо, след което се поставя в пещ при 105 °C за около 10 минути, след което се охлажда в десикатор и се претегля.

Остатъкът в епруветката се състои от стероловата фракция.

- 5.3. Подготовка на триметилсилиловите етери.
- 5.3.1. Реактивът за силилация, състоящ се от смес от пиридин-хексаметилдисилазан-триметилхлоросилан в съотношение 9:3:1 (v/v/v) (бележка 4) се добавя в епруветката, съдържаща алкохолната фракция, в съотношение 50 µl за всеки милиграм стероли, като се избягва абсорбцията на влага (бележка 5).

Бележка 4: Готови за употреба разтвори могат да се доставят от търговската мрежа; други силанизиращи реактиви, като например бис-триметилсилил, трифлуороацетамид + 1 % триметилхлоросилан, който трябва да се разрежда със същия обем безводен пиридин, също могат да се набавят.

▼B

- 5.3.2. Епруветката се затваря, внимателно се разклаща (без да се преобръща), докато стеролите се разтворят. След това се оставя за поне 15 минути при стайна температура и после се центрофугира за няколко минути. Бистрият разтвор е готов за газов хроматографски анализ.

Бележка 5: Слабата опалесценция, която може да се получи, е нормална и не влияе по никакъв начин. Формирането на бял флокулат или появяването на розово оцветяване е знак за наличието на влага или за увреждането на реактива. В този случай опитът се повтаря.

5.4. Газов хроматографски анализ

5.4.1. Предварителни операции, запълване на колонката.

- 5.4.1.1. Капилярната колонка се поставя в газовия хроматограф чрез свързване на входния край с изпарителя, който е свързан с разделителната система, а изходния край — с детектора.

Извършва се обща проверка на газовохроматографския агрегат (течове от газовите вериги, ефикасност на детектора, ефективност на разделителната система и на записващата система и тъй нататък).

- 5.4.1.2. Ако колонката се използва за пръв път, се препоръчва да бъде подложена на кондициониране. Прокарва се слаб поток от газ през колонката, след което газовохроматографският агрегат се включва и се започва постепенно нагряване до достигането и поддържането на температура от поне 20 °C над температурата за експлоатация (бележка 6). Тази температура се поддържа за поне два часа, след което целият агрегат се привежда в работен режим (настройка на газовия поток и разделянето, възпламеняване на пламъка, свързване с електронното записващо устройство, настройване на температурата на пещта за капилярни колонки, детектора и инжектора и тъй нататък) и се записва сигналът с поне два пъти по-голяма чувствителност от тази, която ще се използва при анализа. Ходът на основната линия трябва да е прав, без пикове от какъвто и да било вид и не трябва да се измества.

Отрицателно праволинейно изместване е показател за изтичане от колонковите свързки; положителното изместване е показател за неподходящо кондициониране на колонката.

Бележка 6: Температурата на кондициониране трябва да е винаги поне с 20 °C по-ниска от максималната температура, определена за използваната стационарна фаза.

5.4.2. Избор на условията за работа.

- 5.4.2.1. Насоката за условията за работа е следната:

- температура на колонките: 260 °C ± 5 °C,
- температура на изпарителя: 280 °C,
- температура на детектора: 290 °C,
- линейна скорост на газа носител: хелий — 20 до 35 cm/sec, водород — 30 до 50 cm/sec,
- съотношение на разделяне: 1:50 до 1:100,
- чувствителност на инструмента: 4 до 16 пъти минималното намаляване,
- чувствителност на записване: 1 до 2 mV f.s.,
- скорост на подаване на хартията: 30 до 60 cm/h,

▼B

- количество на инжектираното вещество: 0,5 до 1 µl от разтвора на ТМСЕ.

Тези условия могат да се изменят в светлината на характеристиките на колонковата и газовата хроматография, с оглед получаването на хроматограми, задоволяващи следните условия:

- времето за задържане на β-ситостерола трябва да е 20 ± 5 минути,
- пикът на кампестерола трябва да е: за маслиновото масло (общо съдържание 3 %) — 15 ± 5 % от пълната стойност; за соевото масло (общо съдържание 20 %) — 80 ± 10 % от пълната стойност
- всички налични стероли трябва да са отделени. В добавка на това, че трябва да са разделени, пиковите трябва да бъдат също така напълно отделени един от друг, т.е. следата на пика трябва да се върне напълно до основата, преди да се издигне за следващия пик. Непълното отделяне обаче се допуска, като е предвидено, че пикът при TRR 1,02 може да се изрази количествено чрез използването на перпендикуляр.

5.4.3. Провеждане на анализа.

5.4.3.1. С помощта на микропипетата с вместимост 10 µl се изтегля 1 µl хексан, въвежда се 0,5 µl въздух и впоследствие — 0,5 до 1 µl от разтвора на пробата. Буталото на спринцовката се повдига, за да се изпразни иглата. Иглата се въвежда през мембраната на мястото за инжектиране и след една до две секунди разтворът се инжектира бързо, а иглата се изважда бавно след приблизително пет секунди.

5.4.3.2. Извършва се запис до пълното отмиване на наличните ТМСЕ на стеролите.

Основната линия трябва да отговаря на изискванията на точка 5.4.1.2.

5.4.4. Разпознаване на пиковите.

Разпознаването на индивидуалните пикове се извършва съгласно времената за задържане и в сравнение със смеси от стеролови ТМСЕ, анализирани при същите условия.

Стероите се отмиват в следния ред: холестерол, брасикастерол, 24-метилхестерол, кампестерол, кампестанол, стигмастерол, Δ 7-кампестерол, Δ 5,23-стигмастодиенол, клеростерол, β-ситостерол, ситостанол, Δ 5-авенастерол, Δ 5,24-стигмастодиенол, Δ 7-стигмастенол, Δ 7-авенастерол.

Времената за задържане за ситостерол за колони SE-52 и SE-54 са показани в таблица 1.

Фигури 1 и 2 показват типични хроматограми за някои масла.

5.4.5. Количествена преценка.

5.4.5.1. Изчисляват се лицата на β-холестанола и стероловите пикове при използването на интегратора. Пиковите за всички вещества, които не са включени сред тези, включени в таблица 1, не се вземат под внимание. Коефициентът на отговор за β-холестанола се приема за 1.

5.4.5.2. Концентрацията на всеки отделен стерол, изразена в mg/100 g мастно вещество се изчислява по следния начин:

$$\text{стерол } x = \frac{A_x \times m_s \times 100}{A_s \times m}$$

▼ B

където:

A_x = лицето на пика за стерола, ► **M6** ————— ◄;

A_s = лицето на пика на β -холестанола, ► **M6** ————— ◄;

m_s = масата на добавения β -холестанол, в милиграми;

m = масата на пробата, взета за определяне, в грамове.

6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- 6.1. Записват се индивидуалните концентрации на стеролите в mg/100 g мастно вещество, а сборът им като общо количество на стеролите.
- 6.2. Изчислява се процентното съдържание на всеки отделен стерол чрез отношение на имащото значение лице на пика към сбора от лицата на пиковите на стеролите.

$$\% \text{ на стерола } x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

където:

A_x = лицето на пика за x ;

$\sum A$ = сборът от лицата на пиковите на стеролите.



ДОПЪЛНЕНИЕ

Определяне на линейната скорост на газа

1 до 3 μl метан (или пропан) се инжектират в газовия хроматограф, настроен на нормални условия за работа, и се измерва времето, необходимо на метана или пропана за преминаване през колонката от момента на инжектиране до момента на появяване на пика (t_M).

Линейната скорост на газа, в cm/sec , е представена чрез L/t_M , където L е дължината на колоната, в сантиметри, а t_M е измереното време, в секунди.

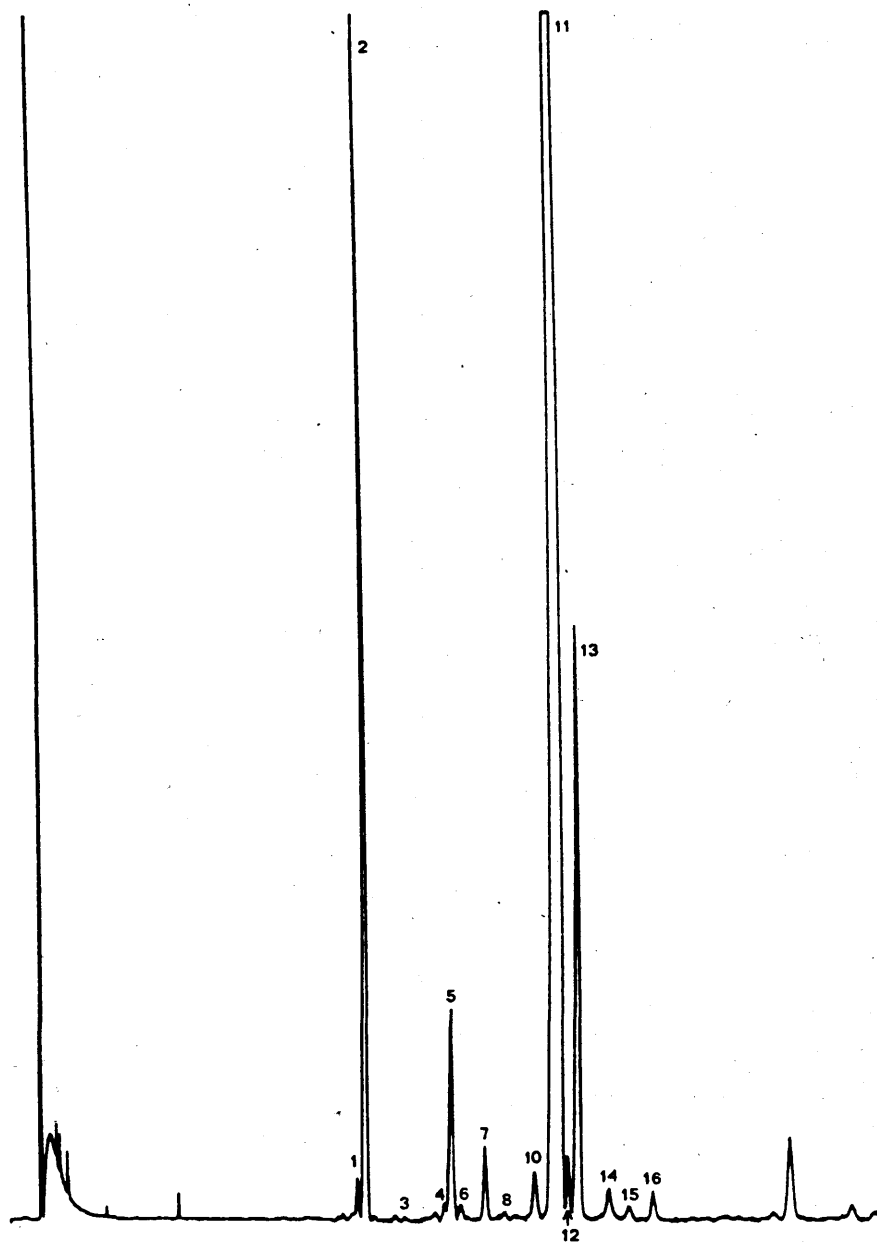
Таблица 1

Относително време за задържане за стеролите

Пик	Идентификация		Относително време за задържане	
			SE 54 колонка	SE 52 колонка
1	холестерол	Δ -5-холестен-3 β -ол	0,67	0,63
2	холестанол	5 α -холестан-3 β -ол	0,68	0,64
3	брасикастерол	[24S]-24-метил- Δ -5,22-холестадиен-3 β -ол	0,73	0,71
4	24-метилен-холестерол	24-метилен- Δ -5,24-холестен-3 β -ол	0,82	0,80
5	кампестерол	[24R]-24-метил- Δ -5-холестен-3 β -ол	0,83	0,81
6	кампестанол	[24R]-24-метил-холестан-3 β -ол	0,85	0,82
7	стигмастерол	[24R]-24-етил- Δ -5,22-холестадиен-3 β -ол	0,88	0,87
8	Δ -7-кампестерол	[24R]-24-метил- Δ -7-холестен-3 β -ол	0,93	0,92
9	Δ -5,23-стигмастадиенол	[24R,S]-24-етил- Δ -5,23-холестадиен-3 β -ол	0,95	0,95
10	хлростерол	[24S]-24-етил- Δ -5,25-хлостадиен-3 β -ол	0,96	0,96
11	β -ситостерол	[24R]-24-етил- Δ -5-холестан-3 β -ол	1,00	1,00
12	ситостанол	24-етил-холестан-3 β -ол	1,02	1,02
13	Δ -5-авенастерол	[24Z]-24-етилиден-5-холестен-3 β -ол	1,03	1,03
14	Δ -5,24-стигмастадиенол	[24R,S]-24-етил- Δ -5,24-холестадиен-3 β -ол	1,08	1,08
15	Δ -7-стигмастенол	[24R,S]-24-етил- Δ 7,24-холестадиен-3 β -ол	1,12	1,12
16	Δ -7-авенастерол	[24Z]-24-етилиден- Δ -7-холестен-3 β -ол	1,16	1,16

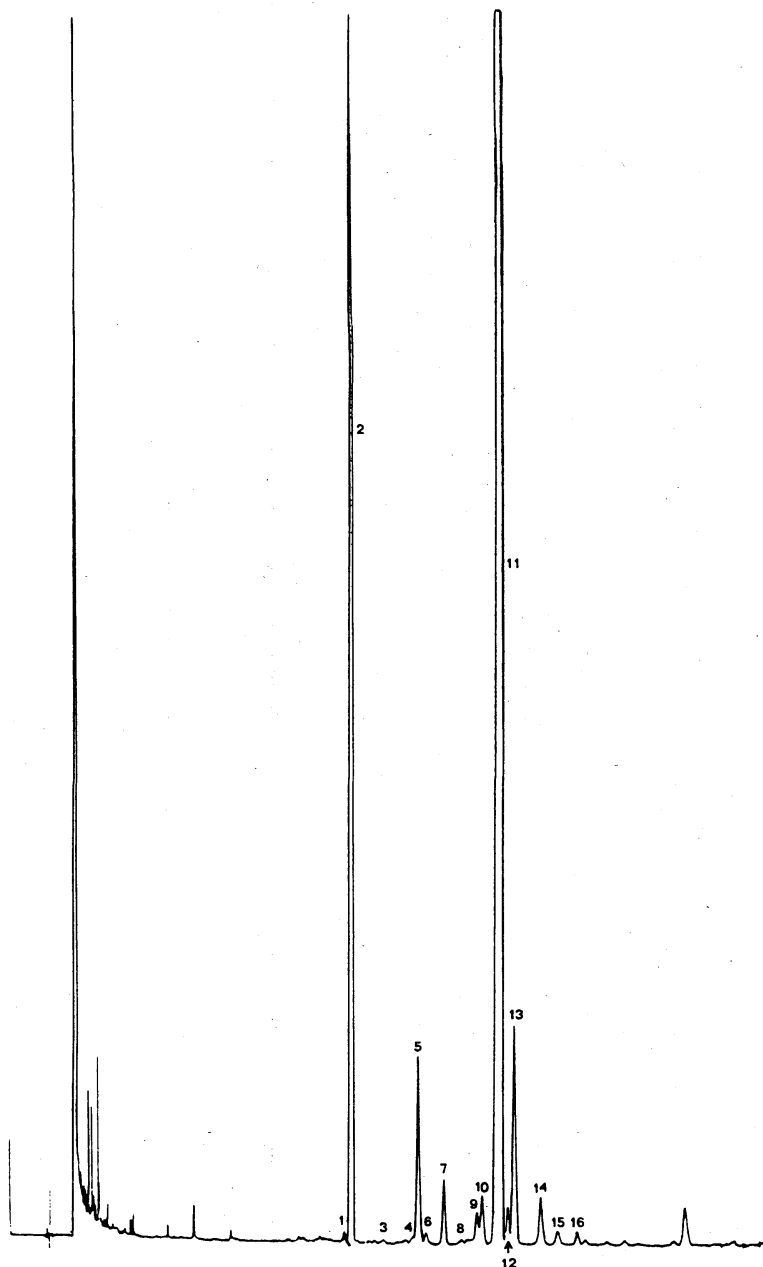
▼B

Фигура 1

Газова хроматограма на стероловата фракция на нерафинирано маслиново масло

▼B

Фигура 2

Газова хроматограма на стероловата фракция на рафинирано маслиново масло



ПРИЛОЖЕНИЕ VI

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ЕРИТРОДИОЛ И УВАОЛ

ВЪВЕДЕНИЕ

Еритродиолът (често подразбиран като гликолите еритродиол и уваол взети заедно) е съставка на неосапуняемата фракция, характерна за някои типове мастни вещества. Намира се в значително високи концентрации в екстрахираното с разтворители маслиново масло и в други масла, такива като пресованото маслиново масло и маслото от семената на гроздето, които също го съдържат, така че неговото наличие може да показва наличието на екстрахирано с разтворители маслиново масло.

1. ОБХВАТ

Методът описва процедура за откриване на еритродиол в мастни вещества.

2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Мастното вещество се осапунява с етанолов разтвор на калиев хидроксид. След това неосапуняемата фракция се екстрахира с диетилов етер и се пречиства чрез пасиране върху колона от диалуминиев триоксид.

След това неосапуняемите вещества се подлагат на тънкослойна хроматография върху плаки със силикагел, докато ивиците, съответстващи на стероловата и еритродиоловата фракция, се разделят. Стеролите и еритродиолът, възстановени от плаката, се преобразуват в триметилсилил етери и сместа се анализира чрез газова хроматография.

Резултатът се изразява като процентното съдържание на еритродиол в сместа от еритродиол и стероли.

3. АПАРАТУРА

- 3.1. Апаратурата, описана в приложение V (определяне на съдържанието на стероли).

4. РЕАКТИВИ

- 4.1. Реактивите, описани в приложение V (определяне на съдържанието на стероли).
- 4.2. Стандартен разтвор на еритродиол — 0,5 % разтвор в хлороформ.

5. ХОД НА ОПИТА

5.1. Подготовка на неосапуняемите вещества

Както е описано в параграф 5.1.2. от приложение V.

5.2. Отделяне на еритродиола и стеролите.

- 5.2.1. Виж параграф 5.2.1. от приложение V.

- 5.2.2. Виж параграф 5.2.2. от приложение V.

- 5.2.3. Приготвяне на 5 % разтвор на неосапуняемите вещества в хлороформ.

С помощта на 0,1-милилитрова микроспринцовка се нанася на хроматографска плака 0,3 ml разтвор на приблизително 1,5 cm от долния ръб на възможно най-тънка и равномерна ивица.

На единия край на плаката се поставят няколко микролитра от разтворите на холестерол и еритродиол, за да служат за сравнение.

- 5.2.4. Плаката се поставя в камерата за промиване, подготвена, както е упоменато в 5.2.1. Околната температура трябва да е около 20 °C. Камерата се затваря веднага с капака и се оставя за отмиване, докато фронтът на разтворителя не достигне приблизително 1 cm от горния ръб на плаката. Плаката се изважда от камерата за промиване, а разтворителят се изпарява под горещ въздушен поток.

▼B

5.2.5. Плаката се опръсква леко и равномерно с алкохолния разтвор на 2,7-дихлорофлуоресцин. Когато плаката се наблюдава под ултравиолетова светлина, ивиците на стерола и еритродиола могат да се познаят по това, че са на едно равнище с тази на стандарта. Маркира се с точки точно по външния ръб на флуоресценцията.

5.2.6. С помощта на метална шпатула се изстъргва силикагелът в маркираните части. Материалът от плаката се поставя в 50 ml колба. Добавят се 15 ml горещ хлороформ, разклаща се добре и се филтрира през фуния с диск от шлифовано стъкло, така че силикагелът да се пренесе върху филтъра. Филтратът се изпарява до обем от 4 до 5 ml, пренася се в калибрована 10 ml епруветка за филтриране с конично дъно, изсушава се чрез леко нагряване под поток от азот и се претегля.

5.3. Подготовка на триметилсилил естерите

Както е описано в параграф 5.3. от приложение V.

5.4. Газовохроматографски анализ

Както е описано в параграф 5.4. на гореописания метод. Условиата за работа на газовият хроматограф при анализа трябва да са такива, че да се извърши стероловият анализ и да се отделят ТМСЕ от еритродиола и уваола.

След като пробата е била инжектирана, записването се продължава докато наличните стероли, еритродиолът и уваолът бъдат отмити. След това се идентифицират пиковите (времената за задържане на еритродиола и уваола, отнесени към β -ситостерола, са съответно около 1,45 и 1,55) и се изчисляват лицата както при стеролите.

6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

$$\text{Еритродиол \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{стероли}}} \times 100$$

където:

A_1 = лицето на пика за еритродиола, ► **M6** ————— ◄;

A_2 = лицето на пика за уваола, ► **M6** ————— ◄;

$\sum A_{\text{стероли}}$ = сборът от лицата на пиковите на стеролите
► **M6** ————— ◄.

Резултатът се изразява до една цифра след десетичната запетая.

▼ **M21***ПРИЛОЖЕНИЕ VII***ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРОЦЕНТНОТО СЪДЪРЖАНИЕ НА
2-ГЛИЦЕРИЛ МОНОПАЛМИТАТ****1. ПРЕДМЕТ И СФЕРА НА ПРИЛОЖЕНИЕ**

Този метод описва аналитичната процедура за определяне на процентното съдържание на палмитинова киселина в позиция 2 на триглицеридите посредством анализа на 2-глицерил монопалмитат.

Методът е приложим за течни растителни масла при стайна температура (20 °C).

2. ПРИНЦИП

След подготовката ѝ маслената проба се подлага на въздействието на панкреатична липаза: частична хидролиза, специфична за позиции 1 и 3 на молекулата на триглицерида, води до появата на моноглицериди в позиция 2. Процентното съдържание на 2-глицерил монопалмитат в моноглицеридната фракция се определя, след силилация, посредством капилярна газова хроматография.

3. АПАРАТУРА И ЛАБОРАТОРНО ОБОРУДВАНЕ

- 3.1. Ерленмайерова колба от 25 ml.
- 3.2. Бехерови чаши от 100, 250 и 300 ml.
- 3.3. Стъклена колонка за хроматография, с вътрешен диаметър 21—23 mm, дължина 400 mm, оборудвана с диск с поресто дъно и кранче.
- 3.4. Градуирани епруветки от 10, 50, 100 и 200 ml.
- 3.5. Колби с вместимост 100 и 250 ml.
- 3.6. Ротационен изпарител.
- 3.7. Центрофужни епруветки с конично дъно, с вместимост 10 ml, с шлифована запушалка.
- 3.8. Центрофуга за епруветки от 10 и 100 ml.
- 3.9. Термостат, който позволява поддържане на постоянна температура от 40 °C ± 0,5 °C.
- 3.10. Калибровани пипети от 1 и 2 ml.
- 3.11. Хиподермична спринцовка от 1 ml.
- 3.12. Микроспринцовка от 100 µl.
- 3.13. Фуния от 1 000 ml.
- 3.14. Газов хроматограф за капилярни колонки, оборудван със система за студено инжектиране „on column“, за директно вкарване на пробата в колонката и с пещ, която е в състояние да поддържа желаната температура с точност до 1 °C.
- 3.15. Инжектор за студено пускане „on column“ за директно вкарване на пробата в колонката.
- 3.16. Пламъчно-йонизационен детектор и електрометър.
- 3.17. Записващ интегратор, адаптиран към електрометъра, с време на отговор под 1 секунда и променлива скорост на подаване на хартията.
- 3.18. Капилярна колонка от стъкло или кварц, с дължина 8—12 метра, с вътрешен диаметър от 0,25 до 0,32 mm, с покритие от метилполисилоксан или фенил метилполисилоксан 5 %, с дебелина 0,10—0,30 µm, която може да се използва при 370 °C.

▼ **M21**

- 3.19. Микроспринцовка с вместимост 10 µl, снабдена със закалена игла, с минимална дължина 7,5 cm, за директно инжектиране върху колонката.

4. РЕАКТИВИ

- 4.1. Силикагел с гранулометричен състав между 0,063 и 0,200 mm (70/280 mesh), приготвен по следния начин: поставете силикагела в порцеланова капсула, изсушете в пещ при 160 °C в продължение на 4 часа, след което оставете да се охлади на стайна температура в ексикатор. Добавете обем вода, равен на 5 % от теглото на силикагела, като процедирайте по следния начин: в ерленмайерова колба от 500 ml претеглете 152 g силикагел и добавете 8 g дестилирана вода, запушете с тапа и разклатете внимателно до равномерно разпределяне на водата. Оставете да престои минимум 12 часа преди употреба.
- 4.2. n-хексан (за хроматография).
- 4.3. Изопропанол.
- 4.4. Воден разтвор на изопропанол, в обемно съотношение 1/1.
- 4.5. Панкреатична липаза. Използваната липаза трябва да има активност между 2,0 и 10 липазни единици/mg. (В търговската мрежа се предлагат панкреатични липази с активност между 2 и 10 единици на милиграм ензим.)
- 4.6. Буферен разтвор: 1 M воден разтвор на трисхидроксиметиламинометан, доведен до pH 8 (проверява се с потенциометър), чрез добавяне на концентрирана солна киселина (1/1 v/v).
- 4.7. Натриев холат с ензимно качество — воден разтвор 0,1 % (разтворът трябва да се използва до 15 дни след приготвянето му).
- 4.8. Калциев хлорид, воден разтвор 22 %.
- 4.9. Диетилов етер за хроматография.
- 4.10. Проявяващ разтворител: смес n-хексан/диетилов етер (87/13) (v/v).
- 4.11. Натриев хидроокис, разтвор 12 тегловни процента.
- 4.12. Разтвор в етилов алкохол на 1 % фенолфталеин.
- 4.13. Газ носител: водород или хелий, за газова хроматография.
- 4.14. Спомагателни газове: водород, минимум 99 %, свободен от влага и органични примеси, и въздух, за газова хроматография, със същата чистота.
- 4.15. Реактив за силианизация: смес пиридин(хексаметилдисилазан) триметилхлоросилан 9/3/1 (v/v/v). (В търговската мрежа се предлагат готови за употреба разтвори. Могат да се използват други реактиви за силилация като бис-триметилсилил трифлуорацетамид + 1 % триметилхлоросилан, разреден със същия обем безводен пиридин.)
- 4.16. Сравнителни проби: чисти моноглицериди или смеси от моноглицериди с известен състав на процентното съдържание, подобен на този на пробата.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка на пробата

- 5.1.1. Маслото със свободна киселинност под 3 % не се нуждае от неутрализация преди хроматографията върху колонката със силикагел. Маслото със свободна киселинност над 3 % трябва да се подложи на неутрализация, както е описано в точка 5.1.1.1.

▼ **M21**

- 5.1.1.1. Във фунията с вместимост 1 000 ml (3.13) налейте 50 g масло и 200 ml n-хексан. Добавете 100 ml изопропанол и такова количество от разтвора на натриевия хидроокис 12 % (4.11), което съответства на свободната киселинност на маслото плюс добавка от 5 %. Разклатете енергично в продължение на една минута. Добавете 100 ml дестилирана вода, разбъркайте отново и оставете в покой.

След декантирането отстранете долния слой от сапуни. Отстранете евентуалните междинни слоеве (клей и неразтворими вещества). Промийте хексановия разтвор от неутрализираната киселина с последователни дози от по 50—60 ml от разтвора изопропанол/вода 1/1 (v/v) (4.4) до изчезване на розовото оцветяване на фенолфталеина.

Отстранете по-голямата част от хексана чрез дестилация под вакуум (използвайте например ротационен изпарител) и прехвърлете маслото в колба от 100 ml (3.5). Изсушете маслото под вакуум до пълното отстраняване на разтворителя.

В края на тази операция киселинността на маслото трябва да бъде под 0,5 %.

- 5.1.2. Поставете 1,0 g масло, приготвено по горепосочения начин, в ерленмайерова колба от 25 ml (3.1) и разтворете в 10 ml проявяваща смес (4.10). Оставете разтвора да престои в продължение на минимум 15 минути преди хроматографията върху колонка със силикагел.

Ако разтворът е мътен, го центрофугирайте, за да гарантирате оптимални условия за хроматография. (Могат да се използват готови за употреба патрони силикагел SPE от 500 mg.)

- 5.1.3. *Подготовка на хроматографската колонка*

Сипете в колонката (3.3) около 30 ml от проявяващия разтвор (4.10), поставете парче памук в долната част на колонката с помощта на стъклена пръчица; натиснете, за да отстраните въздуха.

В бехерова чаша пригответе суспензия от 25 g силикагел (4.1) в около 80 ml проявяващ разтвор и я сипете в колонката с помощта на фуния.

Проверете дали цялото количество силикагел е постъпило в колонката; промийте с проявяващия разтвор (4.10), отворете кранчето и оставете нивото на течността да стигне до около 2 mm над горното ниво на силикагела.

- 5.1.4. *Хроматография върху колонка*

В ерленмайерова колба от 25 ml (3.1) претеглете точно 1,0 g от пробата, приготвена по описания в точка 5.1 начин.

Разтворете пробата в 10 ml проявяващ разтвор (4.10). Сипете разтвора, приготвен по указанията в точка 5.1.3, в хроматографската колонка. Избягвайте движението на повърхността на колонката.

Отворете кранчето и оставете разтвора на пробата да изтече, докато достигне нивото на силикагела. Проявете със 150 ml проявяващ разтвор. Регулирайте дебита на 2 ml/min (така че 150 ml да изтекат в колонката за около 60—70 минути).

Съберете елуата в предварително претеглена колба с вместимост 250 ml. Изпарете разтворителя под вакуум и отстранете последните следи от него под азотен поток.

Претеглете колбата и изчислете събрания екстракт.

▼ **M21**

(В случай че използвате готови за употреба SPE патрони от силикагел, процедирайте по следния начин: поставете 1 ml разтвор (5.1.2) в предварително приготвените с 3 ml n-хексан патрони.)

След перколяция на разтвора проявете с 4 ml n-хексан/диетилов етер 9/1 (v/v).

Съберете елуата в епруветка от 10 ml и го подложете на изпарение под азотен поток до изсъхване.

Подложете сухия остатък на въздействие на панкреатична липаза (5.2). От основно значение е да проверите съдържанието на мастни киселини преди и след преминаването върху SPE патрона).

5.2. Хидролиза с панкреатична липаза

5.2.1. В центрофужна епруветка претеглете 0,1 g масло, приготвено съгласно точка 5.1. Добавете 2 ml буферен разтвор (4.6), 0,5 ml разтвор на натриев холат (4.7) и 0,2 ml разтвор на калциев хлорид, като разклатете добре след всяко добавяне. Затворете епруветката с шлифованата запушалка и я поставете в термостата при $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2. Добавете 20 mg липаза, разклатете старателно (като внимавате да не намокрите запушалката) и поставете епруветката в термостата за точно 2 минути, след което я извадете, разклатете енергично в продължение точно на 1 минута и оставете да се охлади.

5.2.3. Добавете 1 ml диетилов етер, запушете с тапата и разклатете енергично, след което центрофугируйте и прехвърлете етеровия разтвор в чиста и суха епруветка с помощта на микроспринцовка.

5.3. Подготовка на силанизираните деривати и на газовата хроматография

5.3.1. С помощта на микроспринцовка поставете 100 µl разтвор (5.2.3) в епруветка с конично дъно от 10 ml.

5.3.2. Отстранете разтворителя под слаб азотен поток, добавете 200 µl реактив за силанизация (4.15), запушете епруветката и оставете да престои 20 минути.

5.3.3. След 20 минути добавете от 1 до 5 ml n-хексан (в зависимост от хроматографските условия): полученият разтвор е готов за газова хроматография.

5.4. Газова хроматография

Условията на работа са следните:

— температура на инжектора (инжектор „on column“): под температурата на кипене на разтворителя (68 °C);

— температура на детектора: 350 °C;

— температура на колонката: програмиране на температурата на пещта: 60 °C в продължение на 1 минута, увеличавайки с 15 °C на минута до 180 °C, след това с 5 °C на минута до 340 °C, после се поддържа температура от 340 °C в продължение на 13 минути;

— газ носител: водород или хелий, настроен на адекватната линейна скорост с оглед постигане на разделителната способност, отразена във фигура 1. Времето на задържане на триглицерид C₅₄ трябва да бъде 40 + 5 минути (виж фигура 2) (Условията на работа, посочени по-горе, се дават с указателна цел. Всеки оператор следва да ги оптимизира до постигане на желаната разделителна способност. Височината на пика, съответстващ на 2-глицерил монопалмитат, трябва да има минимална величина, равна на 10 % от скалата на записващото устройство.);

▼ **M21**

- количество инжектирано вещество: 0,5—1 µl от разтвора (5 ml) n-хексан (5.3.3).

5.4.1. *Идентифициране на пиковете*

Идентифицирането на индивидуалните моноглицериди се извършва в съответствие с получените времена на задържане и в сравнение със стандартните смеси моноглицериди, анализирани при същите условия.

5.4.2. *Количествена преценка*

Лицето на всеки пик се изчислява с помощта на електронен интегратор.

6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Процентното съдържание на глицерил монопалмитат се изчислява от съотношението между лицето на съответния пик и сбора от лицата на пиковете на всички моноглицериди (виж фигура 2) по формулата:

$$\text{Глицерил монопалмитат (\%)} : \frac{A_x}{\sum A} \times 100,$$

където:

A_x = лицето на пика, съответстващ на глицерил монопалмитат;

$\sum A$ = сборът от лицата на всички пикове на моноглицеридите.

Резултатът се дава с точност до една десета.

7. ПРОТОКОЛ ОТ АНАЛИЗА

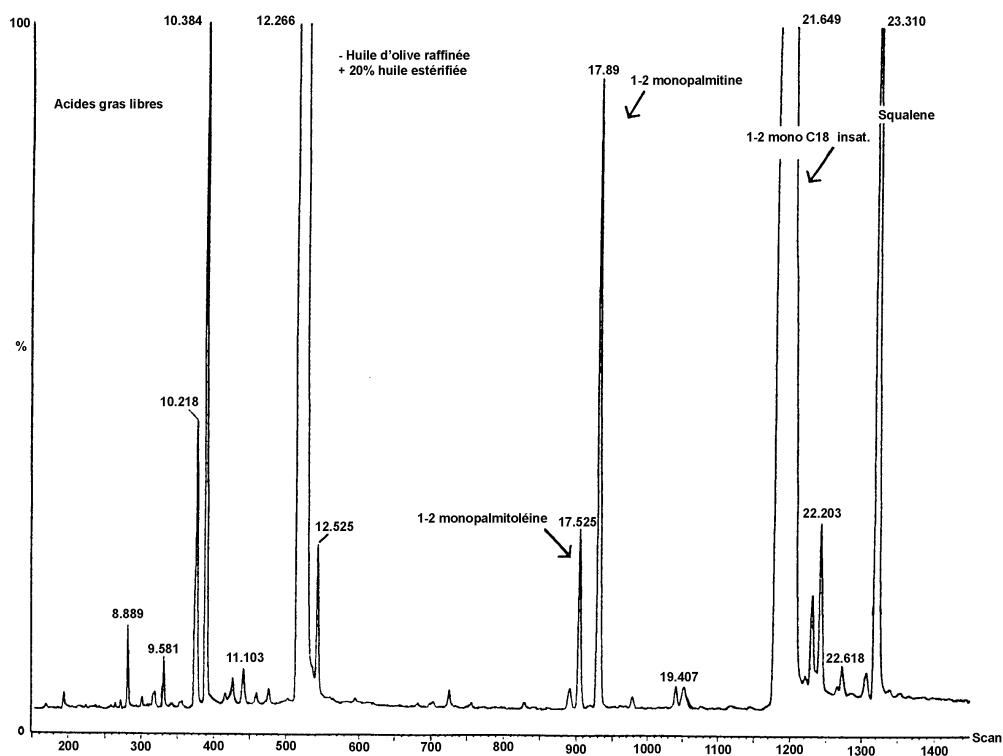
Протоколът от анализа следва да посочва:

- позоваването на този метод,
- всяка информация, необходима за пълното идентифициране на пробата,
- резултата от анализа,
- всяко отклонение от този метод, било то по решение на заинтересованите страни или по друга причина,
- идентификационните данни на лабораторията, датата на анализа и подписа на отговорните лица по неговото провеждане.

▼ M21

Фигура 1

Хроматограма на продуктите от реакцията на силинизация, получени чрез действието на липазата върху рафинирано маслиново масло, към което е добавено 20 % естерифицирано масло (100 %)



Легенда: „acides gras libres“ = свободни мастни киселини; „Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée“ = рафинирано маслиново масло + 20 % естерифицирано масло; „1-2 monopalmitoléine“ = 1-2 монопалмитолеин; „1-2 mono C₁₈ insat.“ = 1-2 моно C₁₈ ненаситени; „squalene“ = скуален

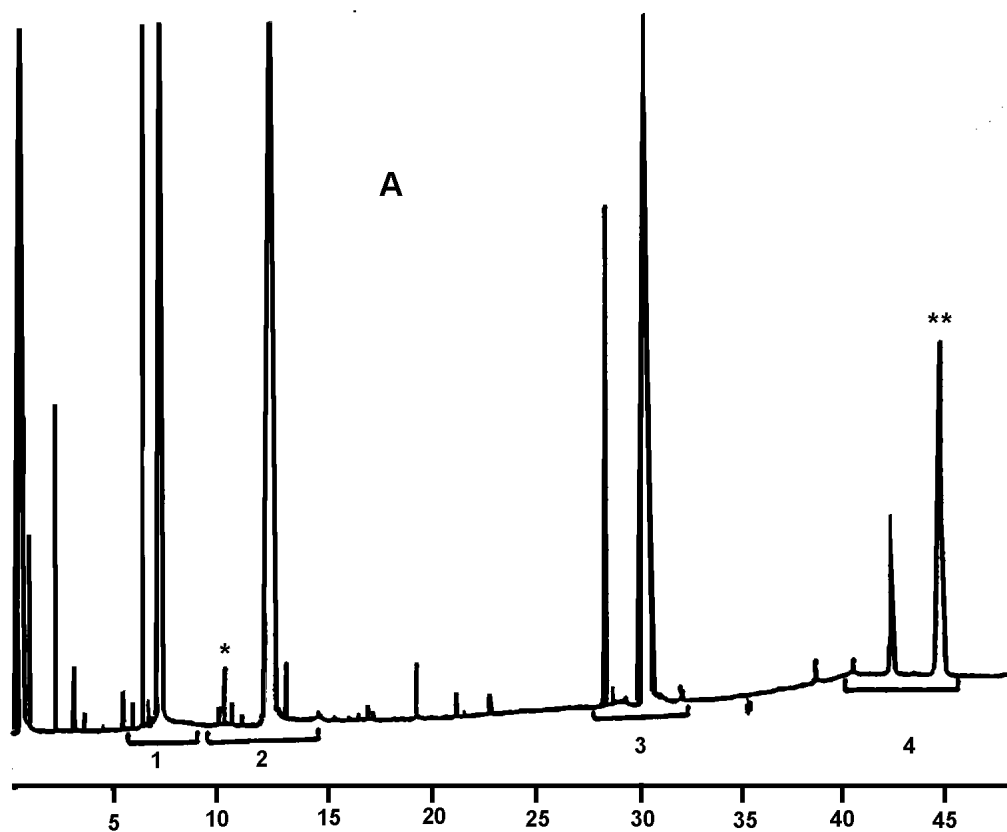
▼ M21

Фигура 2

Хроматограма на:

А) неестерифицирано маслиново масло, след липаза; след силанизация; в тези условия (капиларна колонка 8—12 m) парафиновата фракция се елуира едновременно с диглицеридната фракция или малко след това.

След липаза съдържанието на триглицериди не би следвало да надвишава 15 %.



Легенда:

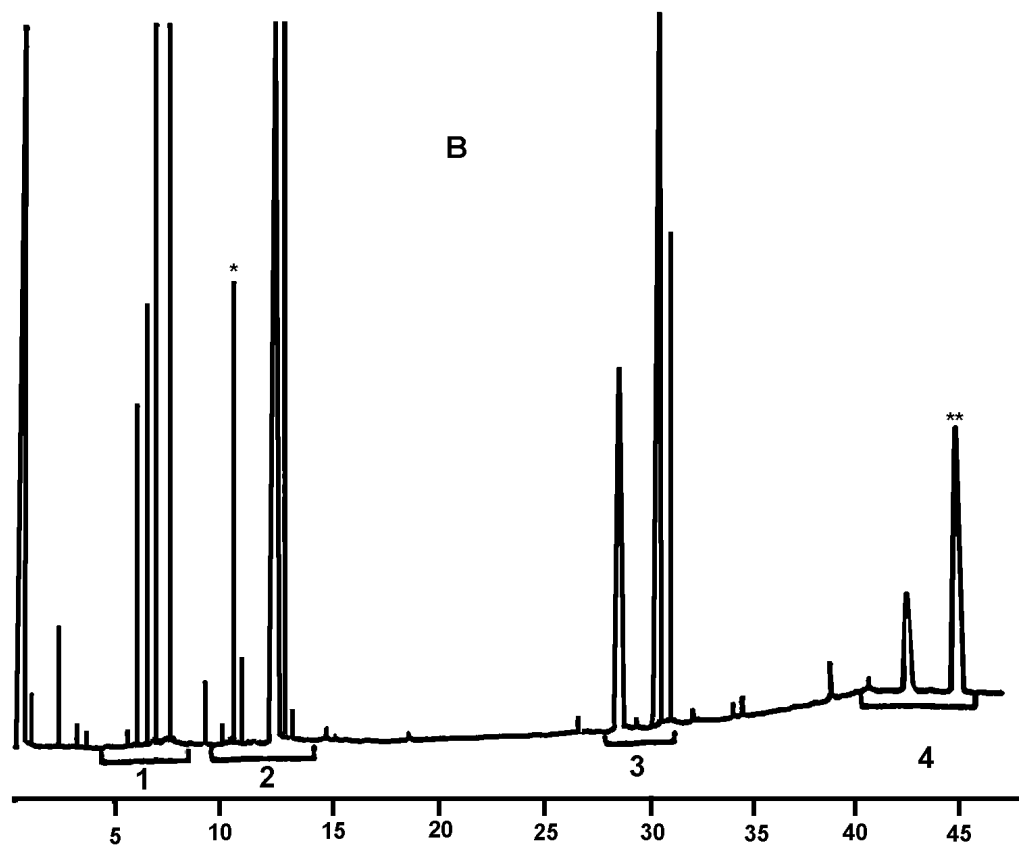
- 1 = Свободни мастни киселини
- 2 = Моноглицериди
- 3 = Диглицериди
- 4 = Триглицериди
- * = 2-монопалмитин
- ** = Триглицерид C₅₄

▼ M21

Хроматограма на:

Б) естерифицирано масло след липаза; след силинизация; в тези условия (капилярна колонка 8—12 m), парафиновата фракция се елуира едновременно с диглицеридната фракция или малко след това.

След липаза съдържанието на триглицериди не би следвало да надвишава 15 %.



Легенда:

- 1 = Свободни мастни киселини
- 2 = Моноглицериди
- 3 = Диглицериди
- 4 = Триглицериди
- * = 2-монопалмитин
- ** = Триглицерид C₅₄

▼ M21

8. БЕЛЕЖКИ

Бележка 1. ПРИГОТВЯНЕ НА ЛИПАЗАТА

В търговската мрежа се предлагат липази със задоволителна липазна активност. Възможно е и да бъдат приготвени лабораторно по следния начин:

Охладете до 0 °C 5 kg пресен свински панкреас. Отстранете околните твърда мазнина и съединителна тъкан и раздробете добре в ножова мелница до получаване на гладка кремообразна смес. Разбъркайте в продължение на 4 до 6 часа с 2,5 литра безводен ацетон, след което центрофугирайте. Екстрахирайте утайката още три пъти със същото количество безводен ацетон, след това два пъти със смес от равни части ацетон и диетилов етер и два пъти с диетилов етер.

Изушете остатъка под вакуум за 48 часа до получаването на устойчив прах, който трябва да се съхранява в хладилник и на сухо.

Бележка 2. ПРОВЕРЯВАНЕ НА АКТИВНОСТТА НА ЛИПАЗАТА

Пригответе емулсия от маслиново масло, както следва:

Разбъркайте в смесител в продължение на 10 минути смес от 165 ml от разтвор на гуми арабика при 100 g/l, 15 g натрошен лед и 20 ml предварително неутрализирано маслиново масло.

Сипете последователно в бехерова чаша с вместимост 50 ml 10 ml от тази емулсия, а след това 0,3 ml разтвор на натриев холат при 0,2 g/ml и 20 ml дестилирана вода.

Поставете бехеровата чаша в термостат, настроен на 37 °C; потопете електродите на pH метъра и спиралната бъркалка.

Прибавете, капка по капка, с помощта на бюрета, разтвор на натриев хидроокис (0,1 N), докато pH достигне 8,3.

Добавете един обем водна суспензия на липазен прах (0,1 g/ml липаза). Веднага щом pH метърът покаже pH 8,3, включете хронометъра и добавете разтвора на натриев хидроокис, капка по капка, така че да се поддържа pH от 8,3. Отчитайте всяка минута обема на консумирания разтвор.

Нанесете данните в координатна система, чиято абсциса съответства на времето, а ординатата ѝ — на милилитрите алкален разтвор (0,1 N), нужни за поддържането на постоянно pH. Трябва да се получи линейна графика.

Активността на липазата, измерена в липазни единици/mg, се изчислява по следната формула:

$$A = \frac{V \times N \times 100}{m}$$

където:

A — е активността в липазни единици/mg;

V — използваният обем на разтвор на натриев хидроокис — 0,1 N за минута, в милилитри (изчислен по графиката);

N — нормалността на разтвора на натриев хидроокис;

m — масата в mg на опитната липаза.

Единица липаза се дефинира като количеството ензим, което отделя 10 микроеквивалента киселина в минута.

▼ M20

▼B*ПРИЛОЖЕНИЕ IX***СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ В УЛТРАВИОЛЕТОВИЯ СПЕКТЪР****ПРЕДИСЛОВИЕ**

Спектрофотометричното изследване в ултравиолетовия спектър може да осигури информация за качеството на дадена мазнина, състоянието ѝ на запазеност и промените, настъпили в нея при технологичните процеси.

Абсорбцията на вълните с дължина, упомената в метода, е вследствие на конюгирани системи от диени и триени. Тези абсорбции са изразени като специфични екстинкции $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (екстинкцията на 1 % разтвор на мазнината в упоменатия разтворител, при дебелина на слоя 1 cm), обикновено обозначаващи като K (наричан още „коэффициент на екстинкция“).

1. ОБХВАТ

Методът описва процедурата за извършване на спектрофотометрично изследване на маслиново масло в ултравиолетовия спектър.

2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Въпросната мазнина се разтваря в нужния разтворител и след това екстинкцията на разтвора се определя при определени дължини на вълната срещу чистия разтворител. Специфичните екстинкции се изчисляват от спектрофотометричните показания.

3. ОБОРУДВАНЕ

3.1. Спектрофотометър за измерване на екстинкцията в ултравиолетовия спектър между 220 и 360 nm, с възможност за отчитане на отделните нанометрични единици.

3.2. Правоъгълни кварцови кювети с капачки, имащи оптична дължина 1 cm. Когато се изпълнят с вода или друг подходящ разтворител, кюветите не трябва да показват помежду си разлики по-големи от 0,01 екстинкционни единици.

3.3. 25-милилитрови градуирани колби.

▼M6

3.4. Хроматографска колба, чиято горна част е с дължина 270 mm и диаметър 35 mm, а долната ѝ част е с дължина 270 mm и диаметър приблизително 10 mm.

▼B**4. РЕАКТИВИ**

4.1. Изооктан (2,2,4-триметилпентан), пречистен за спектрофотометричен анализ. Срещу дестилирана вода той трябва да има пропускливост от не по-малко от 60 % при дължина на вълната 220 nm и не по-малко от 95 % — при 250 nm или

— циклохексан, пречистен за спектрофотометричен анализ: срещу дестилираната вода той трябва да има пропускливост не по-малко от 40 % при 220 nm и не по-малко от 95 % — при 250 nm.

▼M6**▼B**

4.2. Основен диалуминиев триоксид за колонкова хроматография, приготвен и изпитан, както е описано в приложение I.

4.3. n-хексан, за хроматография.

▼B**5. ХОД НА ОПИТА**

5.1. Въпросната проба трябва да е напълно хомогенна и без евентуални примеси. Масла, които са в течно състояние при стайна температура, следва да се филтрират през хартия при температура приблизително 30 °C, твърдите мазнини се хомогенизират и се филтрират при температура от не повече от 10 °C над точката на топене.

5.2. Измерват се прецизно приблизително 0,25 g от така подготвената проба в 25-милилитровата градуирана колба, долива се от определения разтворител до резката и се хомогенизира. Полученият разтвор трябва да е напълно бистър. Ако има наличност на опалесценция или мътност, бързо се филтрира през хартия.

5.3. Напълва се кювета с получения разтвор и се измерва екстинкцията при подходяща дължина на вълната между 232 и 276 nm, като се използва разтворителя като стандарт.

Записаните стойности на екстинкцията трябва да са в рамките от 0,1 до 0,8. Ако не са, измерванията трябва да се повторят, като според нуждата се използват по-концентрирани или по-слаби разтвори.

5.4. Когато се изисква определянето на специфичната екстинкция да се извършва след пасиране върху диалуминиев триоксид, се постъпва по следния начин. Приготвя се суспензия от 30 g основен диалуминиев триоксид в хексан и се поставя в хроматографската колонка. След утаяването на адсорбента излишният хексан се източва до приблизително 1 cm над горния край на диалуминиевия триоксид.

Разтварят се 10 g от мазнината, хомогенизирана и филтрирана, както е описано в 5.1., в 100 ml хексан и разтворът се излива в колонката. Отмивката се събира, а разтворителят се изпарява под вакуум при температура под 25 °C.

С получената по този начин мазнина веднага се постъпва, както е указано в 5.2.

6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

6.1. Записват се специфичните екстинкции (коефициенти на екстинкция) при различните дължини на вълната, изчислено по следния начин:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \times s},$$

където:

K_{λ} = специфичната екстинкция при дължина на вълната λ ;

E_{λ} = екстинкцията, измерена при дължина на вълната λ ;

c = концентрация на разтвора, в g/100 ml;

▼B

s = дебелина на кюветата, в см.

Резултатите се изразяват до две цифри след десетичната запетая.

- 6.2. Спектрофотометричният анализ на маслиновото масло в съответствие с официалния метод на регламентите на ЕИО указва определянето на специфичната екстинкция в разтвор на изооктан при дължина на вълната от 232 и 270 nm и детерминантата K , която е представена чрез:

$$\Delta K = K_M - \frac{K_{M-4} + K_{M+4}}{2},$$

където K_M е специфичната екстинкция при дължина на вълната m , дължината на вълната за максимална абсорбция около 270 nm.



ДОПЪЛНЕНИЕ I

Приготвяне на диалуминиевия триоксид и изпитване на неговата активност

A.1.1. Приготвяне на диалуминиевия триоксид

Поставя се диалуминиевият триоксид, който е бил предварително изсушен в пещ при 380 до 400 °C, за три часа в херметично затворен контейнер, добавя се дестилирана вода в съотношение 5 ml за 100 g диалуминиев триоксид, веднага се затваря контейнерът, разклаща се непрекъснато, след което се оставя да престои поне 12 часа преди употреба.

A.1.2. Проверка на активността на диалуминиевия триоксид

Подготвя се хроматографска колонка с 30 g диалуминиев триоксид. Като се работи, както е описано в параграф 5.4., се пасира смес, състояща се от:

- 5 % студено пресовано маслиново масло, имащо специфична екстинкция поне 0,18 при 268 nm,
- 5 % масло от млени ядки, третирано с пръст в процеса на рафиниране, имащо специфична екстинкция не по-малка от 4 при 268 nm

през колонката.

Ако след пасиране през колонката сместа има специфична екстинкция от повече от 0,11 при 268 nm, диалуминиевият триоксид се допуска за работа, ако не е — нивото на дехидратация трябва да се увеличи.

▼B*ДОПЪЛНЕНИЕ II**Калибриране на спектрофотометъра*

- A.2. Оборудването трябва да се проверява на периоди (поне на всеки шест месеца) както за отговор към дължината на вълната, така и за точността на отговор.
- A.2.1. Дължината на вълната може да се провери при използването на живачна лампа или с помощта на подходящи филтри.
- A.2.2. С оглед на проверката на отговора на фотоклетката и фотоумножителя се постъпва по следния начин: претеглят се 0,2000 g чист калиев хромат за спектрофотометрия и се разтваря в 0,05 N разтвор на калиев хидроксид в 1 000 ml градуирана колба като се долива до резката. Вземат се точно 25 ml от получения разтвор, пренасят се в 500 ml градуирана колба и се разреждат до резката като се използва същият разтвор на калиев хидроксид.

Измерва се екстинкцията на така получения разтвор при 275 nm, като се използва разтвор на калиев хидроксид като стандарт. Измерената екстинкция при използването на 1 cm кювета трябва да е $0,200 \pm 0,005$.



ПРИЛОЖЕНИЕ X А

ГАЗОВОХРОМАТОГРАФСКИ АНАЛИЗ НА МЕТИЛОВИТЕ ЕСТЕРИ
НА МАСТНИТЕ КИСЕЛИНИ

1. ОБХВАТ

Този метод дава общи насоки за прилагането на газова хроматография, като се използват запълнени или капилярни колонки за определяне на качествения и количествен състав на сместа от метилови естери на мастните киселини, получени в съответствие с метода, указан в приложение X Б.

Методът не е приложим за полимеризирани мастни киселини.

2. РЕАКТИВИ

2.1. Газ носител

Инертен газ (азот, хелий, аргон, водород и т.н.), щателно подсушен и с кислородно съдържание не по-малко от 10 mg/kg.

Бележка 1: Водородът, който се използва само с капилярни колонки, може да удвои скоростта на анализа, но е опасен. Достъпни са средства за безопасност.

2.2. Спомагателни газове

2.2.1. Водород (чистота $\geq 99,9\%$), свободен от органични примеси.

2.2.2. Въздух или кислород, свободен от органични примеси.

2.3. Референтен стандарт

Смес от метилови естери на химически чисти мастни киселини или метиловите естери на мазнина с известен състав, за предпочитане по-близък до този на мастното вещество, което ще се анализира.

Трябва да се вземат мерки за предотвратяване на оксидирането на полиненаситените мастни киселини.

3. АПАРАТУРА

Дадените инструкции се отнасят до обикновеното оборудване, използвано за газова хроматография, включващо запълнени и/или капилярни колонки и детектор за пламъчна йонизация. Всеки апарат, показващ ефективността и разделителната способност, указани в 4.1.2., е подходящ.

3.1. Газов хроматограф

Газовият хроматограф се състои от следните елементи.

3.1.1. Система за инжектиране

Използва се система за инжектиране или:

а) със запълни колонки, имащи възможно най-малкото мъртво пространство (в този случай системата за инжектиране трябва да може да се нагрява до температура с 20 до 50 °C по-висока от тази на колонката); или

б) с капилярни колонки, като в този случай системата за инжектиране да е специално проектирана за използване с такива колонки. Тя може да от разделителен тип или може да е от типа без разделяне на колонковия инжектор.

▼B

Бележка 2: При отсъствието на мастни киселини с по-малко от 16 въглеродни атома, може да се използва инжектор с подвижна игла.

3.1.2. Пещ

Пещта трябва да е в състояние на нагрява колонката до температура от поне 260 °C и да поддържа желаната температура с точност до 1 °C за запълнена колонка и с точност до 0,1 °C за капилярна колонка. Последното изискване е особено важно, когато се използва епруетка от кварц.

Използването на програмирано температурно нагряване се препоръчва във всички случаи и в частност за мастни киселини с по-малко от 16 въглеродни атома.

3.1.3. Запълнена колонка

3.1.3.1. Колонка, изградена от материал, който е инертен по отношение на веществата, които ще се анализират (т.е. стъкло или неръждаема стомана), имаща следните размери:

а) дължина: 1 до 3 m. Когато има наличие на дълговерижни мастни киселини (над C₂₀), следва да се използва относително къса колонка. Когато се анализират киселини с 4 до 6 въглеродни атома, се препоръчва да се използва колонка с дължина 2 m.

б) вътрешен диаметър: 2 до 4 mm.

Бележка 3: Когато има наличие на полиненаситени съставки с повече от три двойни връзки, те могат да се разградят с колонка от неръждаема стомана.

Бележка 4: Може да се използва система с двойни запълнени колонки.

3.1.3.2. Пълнеж, състоящ се от следните елементи:

а) *абсорбент:* промита с киселина и силанизирана инфузорна пръст или друг подходящ инертен абсорбент с тесни разлики в размера на частиците (25 µm разлика в частиците в границите от 125 до 200 µm), като средният размер на частиците се определя от вътрешния диаметър и дължината на колонката;

б) *неподвижна фаза:* полярна течност от полиестерен тип (напр. диетиленгликолов сукцинат, бутандиолов полисукцинат, етиленгликолов полиадипат и т.н.), цианосиликони или друга течност, позволяваща изискваното хроматографско фракциониране (виж клауза 4). Неподвижната фаза трябва да възлиза на 5 до 20 % (m/m) от пълнежа. За определени фракционирания може да се използва неполярна неподвижна фаза.

3.1.3.3. Кондициониране на колонката

Докато колонката не е свързана с детектора, ако това е възможно, постепенно се нагрява пещта до 185 °C и се пропуска поток от инертен газ през прясно приготвената колонка с дебит от 20 до 60 ml/min за поне 16 часа при тази температура и за още 2 часа при 195 °C.

3.1.4. Капилярна колонка

3.1.4.1. Тръба, изготвена от материал, инертен към веществата, които ще се анализират (обикновено от стъкло или кварц). Вътрешният диаметър трябва да е между 0,2 и 0,8 mm. Вътрешната повърхност следва да се обработи по подходящ начин (напр. подготовка на повърхността, инактивация), преди да се запълни с покритието от неподвижната фаза. В повечето случаи е достатъчна дължина от 25 mm.

▼B

- 3.1.4.2. Неподвижна фаза, обикновено от типа полигликол (поли(етилен гликол) 20 000), полиестер (бутандиолов полисукцинат) или полярен полисилоксан (цианосиликони). Подходящи са и свързаните (напречносвързани) колонки.

Бележка 5: Съществува риск полярните полисилоксани да създадат трудности при разпознаването и фракционирането на линоленовата киселина и C₂₀ киселините.

Покритието трябва да е тънко, т.е. 0,1 до 0,2 µm.

- 3.1.4.3. Сглобяване и кондициониране на колонката

Спазват се нормалните мерки за безопасност при сглобяване на капилярните колонки, т.е. подреждането на колонката в пещта (адсорбент), избор и сглобяване на свързките (плътност за недопускане на изтичане), поставяне на краищата на колонката в инжектора и детектора (намаляване на мъртвите пространства). Поставя се колонката под поток от газ носител (напр. 0,3 bar (30 kPa) за колонка с дължина 25 mm и вътрешен диаметър 0,3 mm).

Колонката се кондиционира чрез програмиране на пещта за повишаване на температурата от околната с 3 °C/min до температура с 10 °C по-ниска от границата за разграждане на неподвижната фаза. Поддържа се температурата на пещта за един час до стабилизиране на основната линия. Понижава се до 180 °C за работа при изотермални условия.

Бележка 6: Предварително кондиционирани по подходящ начин колонки се предлагат в търговската мрежа.

- 3.1.5. Детектор, за предпочитане такъв, който да може да се нагрява до температура по-висока от тази на колонката.

3.2. **Спринцовка**

Спринцовката трябва да има максимална вместимост 10 µl и да е градуирана на деления от 0,1 µl.

3.3. **Записващо устройство**

Ако ще се използва кривата от записващото устройство за изчисляване на състава на анализираната смес, се изисква електронно записващо устройство с висока прецизност, съвместимо с използвания апарат. Записващото устройство трябва да има следните характеристики:

- а) коефициент на отговор под 1,5 sec за предпочитане 1 sec (коефициентът на отговор е времето, необходимо на писеца на записващото устройство да премине от 0 до 90 % след внезапното въвеждане на сигнал от 100 %;
- б) ширина на хартията минимум 20 cm;
- в) скорост на подаване на хартията, която може да се настройва между 0,4 и 2,5, cm/min.

3.4. **Интегратор**

С помощта на електронен интегратор могат да се извършват бързи и точни изчисления. Настоящият трябва да дава линеен отговор с адекватна чувствителност, а корекцията на изместването на основната линия трябва да е задоволителна.

▼B**4. ХОД НА ОПИТА**

Дейностите, описани от 4.1. до 4.3., се отнасят до използването на детектор с пламъчна йонизация.

Като алтернатива може да се използва газов хроматограф, използващ катарометричен детектор (работещ на принципа на промяна в топлинната проводимост). Условията за работа тогава се изменят, както е описано в клауза 6.

4.1. Условия на опита**4.1.1. Избор на оптимални условия на работа****4.1.1.1. Запълнена колонка**

При избора на условията на работа трябва да се вземат предвид следните променливи величини:

- а) дължината и диаметъра на колонката;
- б) естеството и количеството на неподвижната фаза;
- в) температурата на колонката;
- г) потока на газа носител;
- д) изискваната разделителна способност;
- е) размера на частта от пробата, избран по такъв начин, че свързването на детектора и електрометъра да дава линеен отговор;
- ж) времетраенето на анализа.

Най-общо стойностите, представени в таблица 1 и таблица 2, водят до желаните резултати, т.е. поне 2 000 теоретични плаки за метър дължина на колонката за метилов стеарат и неговото отмиване в рамките на 15 минути.

В случаите, когато апаратът позволява, инжекторът трябва да е с температура от около 200 °C, а детекторът — с температура, равна или по-висока от тази на колонката.

Като правило отношението на дебита на постъпващия към детектора за пламъчна йонизация водород към този на газа носител варира между 1:2 до 1:1, в зависимост от диаметъра на колонката. Потокът на кислорода е около 5 до 10 пъти по-голям от този на водорода.

Таблица 1

Вътрешен диаметър на колонката mm	Поток на газа носител ml/min
2	15 до 25
3	20 до 40
4	40 до 60

Таблица 2

Концентрация на неподвижната фаза % (m/m)	Температура на колонката °C
5	175
10	180
15	185
20	185

▼ B

4.1.1.2. Капилярна колонка

Свойствата ефективност и пропускливост на капилярните колонки означават, че фракционирането на различните съставки и времетраенето на анализа в голяма степен зависят от дебита на газа носител в колонката. Следователно би било необходимо да се оптимизират условията на работа чрез изменение на нейните параметри (или по-просто — към топлинната загуба на колонката), в зависимост от това дали се желае подобряването на фракционирането или извършването на бърз анализ.

4.1.2. Определяне на броя на теоретичните плаки (ефективност) и разделителната способност (виж фигура 1).

Извършва се анализ на смес от метилов стеарат и метилов олеат в приблизително еднакво съотношение (например метилови естери на какаовото масло).

Избира се такава температура на колонката и дебит на газа носител, че максимумът на пика на метиловият стеарат да бъде записан около 15 минути след пика на разтворителя. Използва се достатъчно количество от сместа от метилови естери, така че пикът на метиловия стеарат да заема около три четвърти от цялата скала.

Изчислява се броя на теоретичните плаки, n (ефикасност), с помощта на формулата:

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

и разделителната способност R , с помощта на формулата:

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

където:

dr_1 е разстоянието на задържане, в милиметри, от началото на хроматограмата до максимума на пика на метиловия стеарат;

ω_1 и ω_2 са съответно ширините, в милиметри, на пиковите на метиловия стеарат и метиловия олеат, измерени между точките на пресичане на тангентите при точките на извиване на кривата с основната линия;

Δ е разстоянието, в милиметри, между максималната стойност на върха на метиловия стеарат и метиловия олеат;

▼ M2

и индекса на разделителната способност, I_r , като се използва формулата,

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

където:

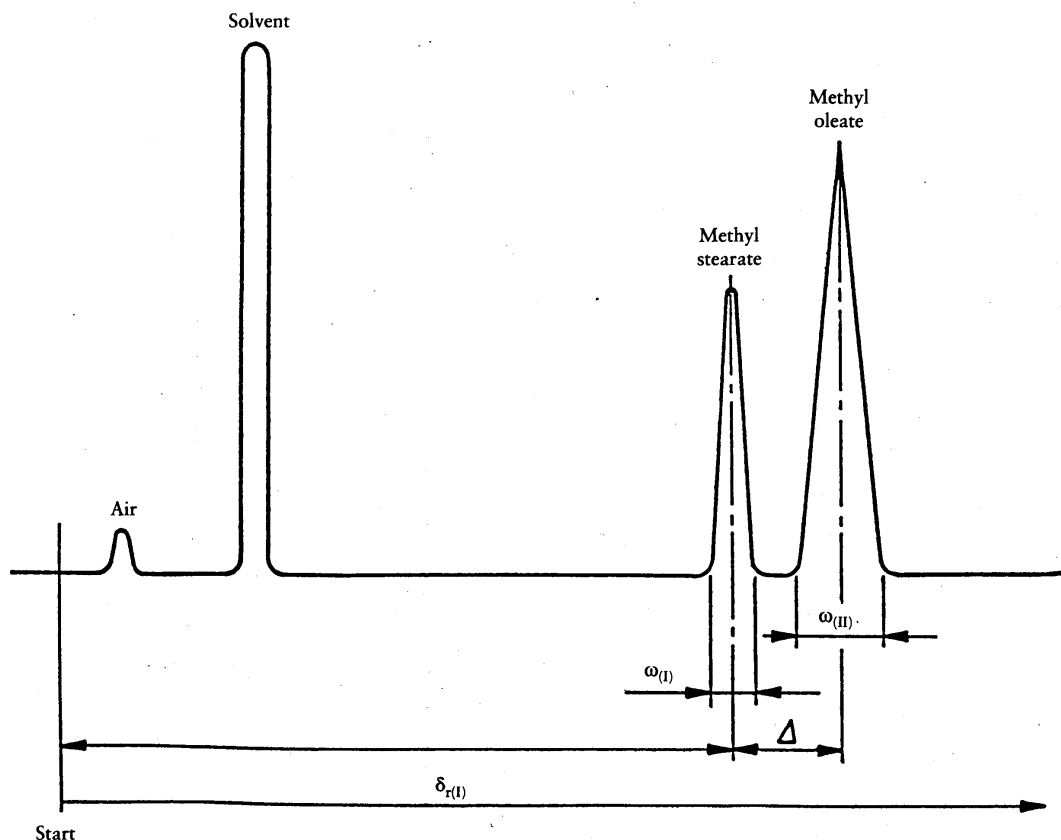
a = височината на най-малкия пик, измерена от основната линия;

b = височината на най-ниската точка в долината между двата съседни пика, измерена от основната линия.

▼ B

Фигура 1

Хроматограма за определяне на броя на теоретичните плаки (ефективност) и разделителната способност



Условията на работа, които ще бъдат избрани, трябва да позволяват поне 2 000 теоретични плаки за метър от дължината на колонката за метилов стеарат и разделителна способност от поне 1,25.

4.2. Размер на пробата

С помощта на спринцовката (3.2.) се изтеглят 0,1 до 2 μl от развора на метиловите естери, приготвен съгласно приложение X Б, и се инжектират в колонката.

В случай, че естерите не са включени в разтвор, се приготвя разтвор в хептан с чистота за хроматография в концентрация от приблизително 100 mg/ml и се инжектират 0,1 до 1 ml от настоящия разтвор.

Ако се провежда анализ за съставките, налични само като следи, размерът на пробата може да се увеличи (до 10 пъти).

4.3. Анализ

Най-общо условията на работа трябва да са тези, определени в 4.1.1.

Независимо от това е възможно да се работи при по-ниска температура на колонката, когато се изисква определянето на мастни киселини с по-малко от 12 въглеродни атома, или при по-висока температура, когато се определят мастни киселини с повече от 20 въглеродни атома. Понякога е възможно да се използва автоматично регулиране на температурата и в двата случая. Например ако пробата съдържа метиловите естери на мастни киселини с по-малко от 12 въглеродни атома, пробата се инжектира при 100 °C (или при 50 до 60 °C ако има наличие на маслена киселина), а температурата веднага се повишава със скорост 4 до 8 °C/min до оптимума. В определени случаи двете процедури могат да се съчетават.

▼B

След програмираното повишаване на температурата, отмиването се продължава при постоянна температура до отмиването на всички съставки. Ако уредът не разполага с автоматично регулиране на температурата, той се използва при две фиксирани нива на температурата между 100 и 195 °C.

Ако е необходимо, се препоръчва извършване на анализ върху две неподвижни фази с различни полярности за потвърждаването на отсъствието на маскирани пикове, например в случай че има едновременно наличие на чифтови $C_{18:3}$ и $C_{20:0}$ или $C_{18:3}$ и $C_{18:2}$.

4.4. Изготвяне на референтната хроматограма и на референтните графики

Анализира се референтната стандартна смес (2.3.) при използването на същите условия на работа като тези, използвани за пробата, и се измерват времената за задържане или разстоянията на задържане за съставните мастни киселини. Построяват се на полулогаритмична хартия, за всяко ниво на ненаситеност, графиките, показващи логаритъма на времето на задържане като функция на броя на въглеродните атоми. При изотермални условия, графиките за правовеижните киселини с еднакво ниво на ненаситеност трябва да са прави линии. Тези линии трябва да са приблизително успоредни.

Необходимо е да се избягват условия, поради съществуването на „маскирани пикове“, при които разделителната способност не позволява разделянето на двете съставки.

5. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

5.1. Качествен анализ

Разпознават се пиковите на метиловите естери за пробата от графиките, изготвени в 4.4., ако е необходимо чрез интерполация.

5.2. Количествен анализ

5.2.1. Определяне на състава

Освен в изключителни случаи, се използва вътрешният метод за нормализация, т.е. приема се, че всички съставки са представени на хроматограмата, така че сборът от лицата под пиковите представлява 100 % от съставките (общо отмиване).

Ако оборудването включва интегратор, използват се данните, получени от него. Ако ли не, определя се лицето под всеки пик чрез умножаване на височината на пика по неговата ширина при средата на височината, а където е необходимо, се вземат предвид различните намалявания, използвани по време на записа.

5.2.2. Метод за изчисляване

5.2.2.1. Общ случай

Изчислява се съдържанието на даден компонент i , изразено в проценти от масата на метиловите естери, чрез определянето на процентите, представени от лицето на съответния пик, отнесено към сумата на лицата на всички пикове, при използване на следната формула:

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

където:

A_i е лицето под пика, съответстващ на компонента i ;

$\sum A$ е сумата от лицата под всички пикове.

▼B

Резултатът се изчислява до една цифра след десетичната запетая.

Бележка 7: В този общ случай се счита, че резултатът от изчислението, основано на относителните лица, представлява процентно съотношение по маса. За случаите, в които това допускане не се позволява, виж 5.2.2.2.

5.2.2.2. Използване на фактори за корекция

В определени случаи, например при наличието на мастни киселини с по-малко от осем въглеродни атома или на киселини с вторични групи, когато се използват детектори, основани на принципа на топлинна проводимост, или когато особено се изисква най-висока степен на прецизност, трябва да се използват фактори за корекция за преобразуването на лицата на пиковите в проценти от масата на съставките.

Факторите за корекция се определят с помощта на хроматограма, получена при анализа на стандартна смес от метилови естери с известен състав, проведен при условия на работа, еднакви с тези, използвани за пробата.

За тази стандартна смес, процентното съотношение от масата на компонента i е представен от формулата:

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

където:

m_i е масата на компонента i в стандартната смес;

$\sum m$ е общият сбор на масите на различните компоненти от стандартната смес.

От хроматограмата на стандартната смес (4.4.), процентното съотношение (лице/лице) за компонента i се изчислява, както следва:

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

където:

A_i е лицето под пика, съответстващ на компонента i ;

$\sum A$ е сборът от лицата под всички пикове.

Тогава факторът за корекция се изчислява като:

$$K_i = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

Най-общо факторите за корекция са изразени по отношение на K_{C16} , така че относителните фактори стават:

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

За пробата съдържанието на компонента i , изразено в проценти по отношение на масата на метиловите естери, е:

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

Резултатите се представят до една цифра след десетичната запетая.

▼ B

5.2.2.3. Използване на вътрешен стандарт

При определени анализи (например, когато не са определени количествено всички мастни киселини, както и когато има наличие на киселини с четири и шест въглеродни атома, наред с киселини с 16 и 18 въглеродни атома, или когато е необходимо да се определи абсолютното количество на някоя киселина в дадена проба) е необходимо да се използва вътрешен стандарт. Често се използват мастни киселини с пет, 15 или 17 въглеродни атома. Трябва да се определи факторът за корекция (ако има такъв) за вътрешния стандарт.

Процентното съотношение по маса на компонента i , изразено като метилови естери, е дадено чрез формулата:

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

където:

A_i е лицето под пика, съответстващ на компонента i ;

A_s е лицето под пика, съответстващ на вътрешния стандарт;

K'_i е факторът за корекция за компонента i (отнесен към K_{C16});

K'_s е факторът за корекция за вътрешния стандарт (отнесен към K_{C16});

m е масата, в милиграми, на частта от пробата;

m_s е масата, в милиграми, на вътрешния стандарт.

Резултатът се представя до една цифра след десетичната запетая.

▼ M2

6. СПЕЦИАЛЕН СЛУЧАЙ — ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТРАНСИЗОМЕРИ

Възможно е да се определи съдържанието на трансизомерите в мастни киселини с брой на въглеродните атоми между 10 и 24 чрез разделяне на метиловите естери като се използват газхроматографски капилярни колони със специфична полярност.

- 6.1. Капилярна колона, изработена от силициев диоксид с вътрешен диаметър между 0,25 mm и 0,32 mm и дължина 50 m, покрита с цианопрописиликон, като дебелината на покритието е между 0,1 и 0,3 μm (тип SP 2380, C.P. sil 88, silor 10 и подобни типове).

▼ M21

- 6.2. Метиловите естери се приготвят по способ Б, определен в приложение X Б. Масните вещества със свободна киселинност над 3 % следва да се неутрализират предварително съгласно точка 5.1.1 от приложение VII.

▼ M2

- 6.3. Работните условия за газовата хроматография като цяло са, както следва:

— изменението на температурата на колоната е между 150 °C и 230 °C (например 165 °C за 15 минути и след това нарастване с по 5 °C за минута до 200 °C);

— температура на инжектора: 250 °C, ако се използва разделителна система или първоначалната температура на колоната, ако се използва колонна система;

▼ M2

— температура на детектора: 260 °C;

— разход на носещия газ (хелий и водород): 1,2 ml за минута.

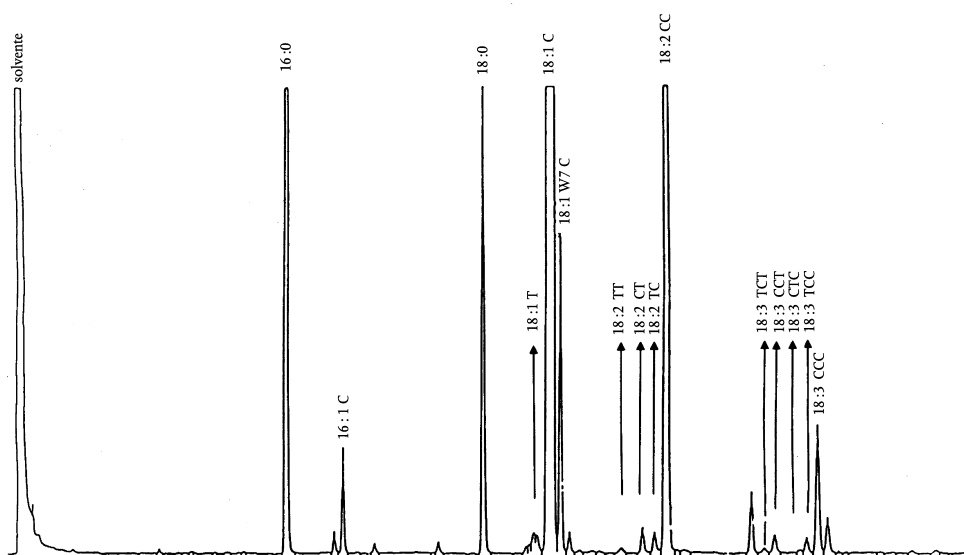
Инжектираното количество трябва да бъде такова, че, при условията на използваната чувствителност, височината на пика, съответстващ на метиловия естер на арахидоновата киселина, да бъде равна на или по-голяма от 20 % от основата на скалата.

- 6.4. Идентификацията на различните метилови естери се извършва въз основа на времената на задържане, които се сравняват с тези на сравнителните смеси (както е показано в точка 2.3.)

Естерите на трансмастните киселини се извличат преди съответните цисизомери. На фигура 2 е даден пример за хроматограма.

Фигура 2:

Газхроматограма на трансизомерите на мастна киселина, като се използва капиларна колона



- 6.5. Ефективността на колоната, определена съгласно точка 4.1.2., трябва да бъде такава, че да позволява разделяне на някои критични двойки, например двойката образувана от масива от пикове на трансолеиновите киселини и олеиновата киселина, транс C18:1/цис C18:1, с индекс на разделителна способност по-голям от 2.
- 6.6. Процентът на различните трансмастни киселини се изчислява въз основа на връзката между повърхността на съответния пик и сумата от повърхностите на всички представени пикове.

Процентното съдържание, което се взема предвид, е:

- трансолеинови киселини (T 18: 1), дадени в приложение I към настоящия регламент — като сума от трансолеиновите изомери;
- цис-транс и транс-цис линоловите киселини [(CT/TC) 18:2], дадени в приложение I към настоящия регламент — като сума от транслиноловите изомери;
- транс-цис-транс, цис-цис-транс, цис-транс-цис, транс-цис-цис линоленовите киселини [(TCT + CCT + CTC + TCC) 18:3], дадени в приложение I към настоящия регламент — като сума от транслиноленовите изомери.

▼ **M2**

Забележка 8: Като се вземат под внимание особените характеристики на този метод, моля резултатите да се дават с точност до втория знак след десетичната запетая.

▼ **B**

► **M2** 7. ◀ СПЕЦИАЛЕН СЛУЧАЙ — ИЗПОЛЗВАНЕ НА КАТАРОМЕТРИЧЕН ДЕТЕКТОР (РАБОТЕЩ НА ПРИНЦИПА НА ПРОМЕНИТЕ В ТОПЛИННАТА ПРОВОДИМОСТ)

Газов хроматограф, използващ детектор, работещ на принципа на промените в топлинната проводимост (катарометър), може също да се използва за определяне на качествения и количествения състав на сместа от метилови естери на мастните киселини. Ако се използва такъв, условията, определени в клауза 3 и клауза 4, трябва да се изменят, както е показано в таблица 3.

За количествен анализ се използват факторите за корекция, определени в 5.2.2.2.

Таблица 3

Променливи	Стойност/състояние
Колонка	Дължина: 2 до 4 m Вътрешен диаметър
Адсорбент	Размер на частиците между 160 и 200 µm
Концентрация на неподвижната фаза	на 15 до 25 % (m/m)
Газ носител	Хелий или, ако няма, водород, с възможно най-ниско кислородно съдържание
Спомагателни газове	Няма
Температура на инжектора	От 40 до 60 °C над тази на колонката
Температура на колонката	180 до 200 °C
Поток на газа носител	Обикновено между 60 и 80 ml/min
Размер на инжектираната част от пробата	Обикновено между 0,5 и 2 µl

► **M2** 8. ◀ ДОКЛАД ЗА ОПИТА

Докладът за опита трябва да описва методите, използвани за приготвянето на метиловите естери, за газовия хроматографски анализ и за получените резултати. Също така той трябва да включва всички подробности около извършването, които не са упоменати в настоящия Международен стандарт, или разгледани като незадължителни, както и подробности относно всички инциденти, които може да са повлияли на резултатите.

Докладът за опита трябва да включва цялата информация, необходима за пълното разпознаване на пробата.

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

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

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

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

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

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

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

(b) determination of the fatty acid composition:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

METHODS FOR PREPARING THE FATTY ACID METHYL ESTERS**1. Method A: Trans-esterification with cold methanolic solution of potassium hydroxide****1.1. Purpose**

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

1.2. Principle

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

1.3. Reagents

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

Heptane, chromatographic quality.

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

1.4. Apparatus

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

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

1.5. Procedure

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

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

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

2.2. Principle

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

2.3. Reagents

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

2.4. Apparatus

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

2.5. Procedure

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

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

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

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

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

2.6.1.2. Apparatus

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

— 1 and 2 ml graduated pipettes.

2.6.1.3. Reagents

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

Hexane, chromatographic quality.

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

2.6.1.4. Procedure

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

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

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

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

2.6.2. Method D**2.6.2.1. Principle**

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

2.6.2.2. Apparatus

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

▼ M19

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

2.6.2.3. Reagents

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

2.6.2.4. Procedure

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

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

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

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

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

3. Precision parameters

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

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

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

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

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

Myristic (C14:0).

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

▼ M19

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

Margaric (C17:0).

Margaroleic (C17:1).

Stearic (C18:0).

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

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

Arachidic (C20:0).

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

Eicosenoic (C20:1).

Behenic (C22:0).

Lignoceric (C24:0).

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

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

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

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

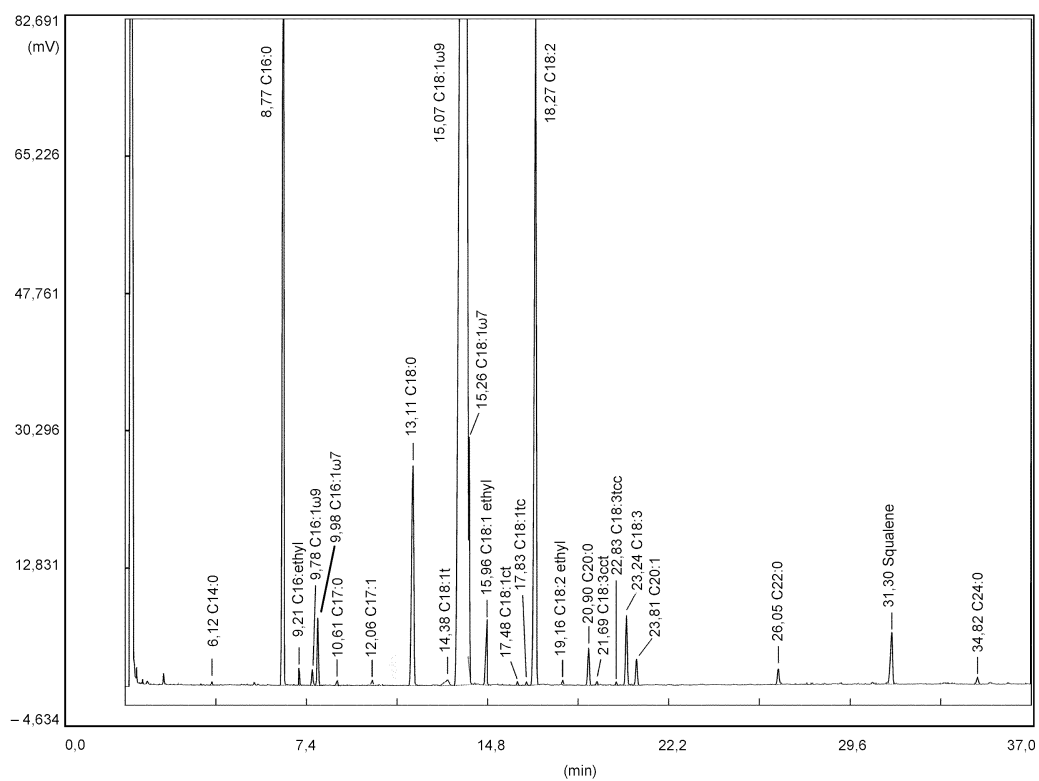
▼ **M19**

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



ПРИЛОЖЕНИЕ XI

ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА ЛЕТЛИВИТЕ ХАЛОГЕНИРАНИ
РАЗТВОРИТЕЛИ В МАСЛИНОВОТО МАСЛО

1. МЕТОД
Газов хроматографски анализ по способа на височинния газов обем.
2. ОБОРУДВАНЕ
 - 2.1. Апарат за газова хроматография с детектор за улавяне на електрони (ДУЕ).
 - 2.2. Апарат за височинен газов обем.
 - 2.3. Газовохроматографска колонка, стъклена, с дължина 2 m и диаметър 2 mm, неподвижна фаза. OV101 10 % или еквивалентен за импрегниране на калцирана инфузорна почва, промита с киселина и силанизирана, с размер на частиците между 80 и 100 mesh.
 - 2.4. Пренасящи и спомагателни газове: азот за газова хроматография, подходящ за разпознаване чрез електронно улавяне.
 - 2.5. Стъклени колби, от 10 до 15 ml, с тефлоново покритие и алуминиеви тапи, и приспособление за вкарване на спринцовка.
 - 2.6. Щипки за херметично затваряне.
 - 2.7. Газова спринцовка, от 0,5 до 2 ml.
3. РЕАКТИВИ
Стандартни: халогенирани разтворители със степен на чистота, подходящи за газова хроматография.
4. ХОД НА ОПИТА
 - 4.1. Претеглят се точно 3 g масло в стъклена колба (която няма да се използва повече); затваря се херметично. Поставя се в термостат при 70 °C за един час. Като се използва спринцовка, внимателно се отнемат 0,2 до 0,5 ml от височинния обем. Инжектира се в колонката на газовия хроматографски апарат, настроен както следва:
 - температура на инжектора: 150 °C;
 - температура на колонката: 70 до 80 °C;
 - температура на детектора: 200 до 250 °C.Могат да се използват и други температурни стойности, стига резултатът да остане еквивалентен.
 - 4.2. Референтни разтвори: подготвят се стандартни разтвори като се използва рафинирано маслиново масло без следи от разтворители с концентрации от 0,05 до 1 ppm (mg/kg), които да съответстват на предполагаемото съдържание на пробата. Халогенираните разтворители могат да се разреждат с пентан.
 - 4.3. Количествено измерване: изчислява се съотношението между повърхностите или покачванията на пиковите на пробата и стандартния разтвор с предполагаема най-близка концентрация. Ако отклонението е по-голямо от 10 %, анализът трябва да се повтори, като се проведе сравнение с друг стандартен разтвор, докато отклонението се сведе в рамките на 10 %. Съдържанието се определя въз основа на средната стойност от отделните инжектирания.
 - 4.4. Изразяване на резултатите: в ppm (mg/kg). Границата на разпознаване по този метод е 0,01 mg/kg.

▼ **M22***ПРИЛОЖЕНИЕ XII***МЕТОД НА МЕЖДУНАРОДНИЯ СЪВЕТ ЗА МАСЛИНОВОТО
МАСЛО ЗА ОРГАНОЛЕПТИЧЕН АНАЛИЗ НА НЕОБРАБОТЕНО
МАСЛИНОВО МАСЛО****1. ЦЕЛ И ОБЛАСТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ**

Настоящият метод се основава на Решение № DEC-21/95-V/2007 от 16 ноември 2007 г. относно преразгледания метод на Международния съвет за маслиновото масло за органолептичен анализ на необработеното маслиново масло. Той има за цел да установи процедура за анализ на органолептичните свойства на необработеното маслиново масло по смисъла на приложение XVI, точка 1 от Регламент (ЕО) № 1234/2007 и да установи метод за тяхното класифициране въз основа на тези характеристики. Методът съдържа също така указания за етикетиране по избор.

Описаният метод се прилага само за необработеното маслиново масло и за неговото класифициране или етикетиране в зависимост от интензитета на разграничените недостатъци, на вкуса на плодове и на другите положителни признаци, определени от подбрани, обучени и проверени дегустатори, които работят в група.

2. ОБЩИ ПОЛОЖЕНИЯ

По отношение на общия основен речник, залата за дегустация, чашата за дегустация на маслиново масло и всички останали въпроси, свързани с настоящия метод, се препоръчва да се спазват изискванията на Международния съвет за маслиновото масло, и по-специално тези, предвидени в Решение № DEC-21/95-V/2007 от 16 ноември 2007 г. относно преразгледания метод за органолептичен анализ на необработеното маслиново масло.

3. СПЕЦИФИЧЕН РЕЧНИК**3.1. Положителни признаци**

С вкус на плодове: съвкупност от усещанията, свързани с обонянieto, характерни за маслиновото масло, в зависимост от сорта на маслините, произтичащи от здрави и пресни маслини, зелени или зрели, възприети пряко и/или непряко през носа.

Признакът „с вкус на плодове“ се категоризира като *вкус на зелен плод*, когато усещанията, свързани с обонянieto, напомнят тези от зелените плодове, характерни за маслото, получено от зелени плодове.

Признакът „с вкус на плодове“ се категоризира като *вкус на зрял плод*, когато усещанията, свързани с обонянieto, напомнят тези от зрелите плодове, характерни за маслото, получено от зелени и зрели плодове.

Горчив: основен вкус, характерен за масло, получено от зелени маслини или от маслини в начален стадий на зреене, възприет от рецепторите във V-образната част на езика.

Стипчив: сложното усещане за стягане и щипене в устата, характерно за масло, произведено в началото на кампанията, предимно от все още зелени маслини, което може да се възприеме чрез цялата устна кухина и в частност чрез гърлото.

3.2. Отрицателни признаци

Мухлясало/кални отлагания: характерен вкус на масло, получено от маслини, складиращи на купчини или съхранявани при такива условия, че са достигнали напреднал стадий на анаеробна ферментация или на масло, което е било в контакт с отложена „кал“, в която също се е развил процес на анаеробна ферментация в бъчвите и подземните цистерни.

Плесен—влага: характерен вкус на масло, получено от маслини, в които са се развили големи количества плесен и ферменти поради съхранението на плодовете на влага в продължение на няколко дни.

▼ **M22**

Винено-оцетен/кисело-горчив: характерен за някои видове масло вкус, който напомня за вино или оцет. Дължи се основно на образуването на ацетатна киселина, етил ацетат и етанол в резултат на процес на окисляване на маслините или на кюспето, пресовани в недостатъчно добре измити съдове.

Металически: вкус, който напомня за метал. Характерен за масло, престояло в продължителен контакт с метални повърхности при нарязването, смесването, пресоването или съхранението.

Граниво: вкус на масло, преминало през интензивен процес на самоокисляване.

Затоплено или прегорено: характерен вкус на масло, предизвикан от прекалено и/или продължително загряване при получаването, особено когато пастираното вещество се смесва температурно, ако това е извършено при неподходящи температурни условия.

Сено—дърво: характерен вкус на някои масла, получени от сухи маслини.

Груб: характерен за някои стари масла, които в устата създават усещане за плътност и кашкавост.

Мазно: вкус на масло, който напомня вкуса на петролни продукти, смазочни материали или минерални масла.

Зеленчукова вода: вкус, придобит от масло в резултат на продължителен контакт със зеленчуковата вода, в която е започнал процес на ферментация.

Саламура: вкус на масло, извлечено от маслини, които са държани в солен разтвор.

Коило: характерен вкус на масло, получено от маслини, които са били пресовани върху нови подложки от коило. Вкусът може да се различава в зависимост от това, дали подложките са направени от зелено или сушено коило.

С мирис на почва: вкус на масло, получено от маслини, които са били събрани кални или покрити с почва, без да бъдат измити.

С вкус на ларви: вкус на масло, получено от маслини, които са били нападнати и силно заболели от ларвата на маслиновата мушичка (*Bactrocera Oleae*).

Краставица: вкус, получен, когато маслото е престояло пакетирано херметически прекалено дълго, най-вече в тенекени кутии, и който се дължи на образуването на 2,6-нонадиенал.

Влажно дърво: вкус, характерен за масло, извлечено от маслини, замръзнали на дървото.

3.3. Терминология за използване по избор при етикетирането

При поискване организаторът на групата дегустатори може да удостовери, че изпитваните масла съответстват на определенията и скалите, които отговарят на следните изрази и прилагателни в зависимост от интензитета и възприятието на признаците:

а) за всеки положителен признак, споменат в точка 3.1 (*с вкус на плодове*, където е приложимо, категоризиран като *вкус на зелен плод* или *вкус на зрял плод*, *стипчив* или *горчив*):

- i) терминът „интензивен“ може да бъде използван, когато медианата на съответния признак е по-висока от 6;
- ii) терминът „среден“ може да бъде използван, когато медианата на съответния признак се намира между 3 и 6;
- iii) терминът „лек“ може да бъде използван, когато медианата на съответния признак е по-ниска от 3;

▼ M22

- iv) съответните признаци могат да бъдат използвани, без да се прибегва до прилагателните, посочени в подточки i), ii) и iii), когато медианата на съответния признак е по-висока или равна на 3;
- б) терминът „балансирано“ може да бъде използван за масло, което не е небалансирано. Под липса на баланс се разбира обонятелно-вкусово и допирно усещане на маслото, при което медианата на признака *горчив* и/или тази на признака *стипчив* е по-висока с две единици от медианата на признака *с вкус на плодове*;
- в) изразът „масло с мек вкус“ може да бъде използван за масло, за което медианата на признака *горчив* и на признака *стипчив* е по-ниска или равна на 2.

4. ГРУПА ДЕГУСТАТОРИ

Групата дегустатори се състои от организатор на групата и от 8 до 12 дегустатори.

Организаторът на групата трябва да е преминал стабилно обучение и да е познавач и компетентен специалист по различните видове масло. Той носи отговорност за групата, за организацията и функционирането ѝ, подготвянето, кодирането и представянето на пробите на дегустаторите, както и за събирането и статистическата обработка на данните.

Организаторът на групата дегустатори подбира дегустаторите и се грижи за обучението им и контрола на тяхната работа, за да гарантира запазването на способностите им на необходимото равнище.

Дегустаторите за органолептичните проверки на маслиновото масло трябва да бъдат подбрани и обучени в зависимост от тяхната способност да правят разлика между подобни проби в съответствие с ръководството на Международния съвет за маслиновото масло за подбора, обучението и контрола на квалифицираните дегустатори на необработени маслинови масла.

Групите дегустатори трябва да се ангажират да участват в органолептичните оценки, предвидени на национално и международно равнище, както и на равнището на Общността за периодичен контрол и хармонизиране на критериите за възприятие. Освен това в случай на групи дегустатори, одобрени съгласно разпоредбите на член 4, параграф 1 от настоящия регламент, те трябва всяка година да предоставят на съответната държава-членка цялата информация относно техния състав и броя на извършените оценки в качеството им на одобрени групи дегустатори.

5. ПРОЦЕДУРА ЗА ОРГАНОЛЕПТИЧНА ОЦЕНКА И КЛАСИФИКАЦИЯ

5.1. Ползване на профилиращия лист от страна на дегустатора

Профилиращият лист, който следва да се ползва от дегустатора, е даден в допълнение А към настоящия метод.

Всеки дегустатор — член на групата трябва да помирише и после да дегустира маслото, подложено на оценка. След това той трябва да нанесе върху скалите от по 10 cm на своя профилиращ лист интензитета, с който възприема всеки от положителните и отрицателните признаци ⁽¹⁾. В случай на възприятие на признака „с вкус на плодове“, категоризиран като „вкус на зелен плод“ или „вкус на зрял плод“, дегустаторът зачертава съответното поле върху профилиращия лист.

В случай че се установят отрицателни признаци, които не са посочени върху профилиращия лист, те се вписват в рубриката „други“, като се използват терминът или термините, които ги описват най-точно измежду определените по-горе.

⁽¹⁾ Дегустаторът може да не дегустира масло, за което усети чрез пряко помиришване изключително интензивен отрицателен признак. Той следва да отбележи върху профилиращия лист това извънредно обстоятелство.

▼ M22

5.2. Ползване на данните от страна на организатора на групата дегустатори

Организаторът на групата трябва да събере профилиращите листи, попълнени от всеки от дегустаторите; той трябва да провери интензитетите, които са вписани за различните признаци; ако се констатира аномалия, той изисква от дегустатора да провери своя профилиращ лист и ако е необходимо, да повтори опита.

Организаторът на групата може да въведе данните на всеки дегустатор в компютърна програма, която изчислява медианата по статистическия метод в допълнение Б. Въвеждането на данните за една проба се осъществява с помощта на матрица, съставена от 9 колони, отговарящи на 9 сетивни признаци и от n редове, отговарящи на n дегустатори от групата.

Когато негативен признак, установен от поне 50 % от групата, е вписан в рубриката „други“, медианата на този недостатък се изчислява и маслото се класифицира съответно.

Организаторът на групата може да удостовери, че оценяваното масло изпълнява условията, посочени в точка 3.3, буква а), що се отнася до термините „вкус на зелен плод“ и „вкус на зрял плод“ само ако поне 50 % от членовете на групата са посочили, че са установили зеления или зрял характер на признака „с вкус на плодове“.

В случай на анализи, извършвани в рамките на проверки на съответствието, се извършва един опит. В случай на противоречиви анализи организаторът на групата трябва да осъществи провеждането на двоен анализ. В случай на анализи за отмяна оценяването трябва да се извърши три пъти. В тези случаи медианата на признаците се изчислява въз основа на средното аритметично от медианите. Всички повторни оценки трябва да се проведат по време на различни сесии.

5.3. Класифициране на маслото

Маслото се класифицира в категориите, посочени по-долу, в зависимост от медианата на недостатъците и от медианата на признака „с вкус на плодове“. Медианата на недостатъците се определя като медианата на недостатъците, за който е установен най-висок интензитет. Медианата на недостатъците и медианата на признака „с вкус на плодове“ се изразяват с един десетичен знак и стойността на стабилния коефициент на отклонение при повторемост не трябва да надхвърля 20 %.

Класифицирането на маслото се осъществява чрез сравнение на стойността на медианата на недостатъците и на медианата на признака „с вкус на плодове“ с референтните скали, посочени по-долу. При определянето на границите на тези скали е взета предвид грешката на метода и те се считат за абсолютни. Компютърните програми позволяват класифициране под формата на таблица със статистически данни или на графика.

- а) Необработено маслиново масло „екстра качество“: медианата на недостатъците е равна на 0 и медианата на признака „с вкус на плодове“ е по-висока от 0;
- б) Необработено маслиново масло: медианата на недостатъците е по-висока от 0 и по-ниска или равна на 3,5 и медианата на признака „с вкус на плодове“ е по-висока от 0;
- в) Маслиново масло за осветление: медианата на недостатъците е по-висока от 3,5 или медианата на недостатъците е по-малка или равна на 3,5, а медианата на признака „с вкус на плодове“ е равна на 0.

5.4. Специален случай

Когато медианата на положителен признак, различен от признака „с вкус на плодове“, е по-висока от 5,0, организаторът на групата го отбелязва върху сертификата за анализ на маслото.

▼ **M22***Допълнение А***Профилиращ лист за необработено маслиново масло****ИНТЕНЗИТЕТ НА ВЪЗПРИЕМАНЕ НА НЕДОСТАТЪЦИТЕ**

Мухлясало/кални отлагания | _____ →

Плесен—влага—с мирис на почва | _____ →

Винено-оцетен
Кисело-горчив | _____ →

Металически | _____ →

Граниво | _____ →

Други (посочете кои) | _____ →

ИНТЕНЗИТЕТ НА ВЪЗПРИЕМАНЕ НА ПОЛОЖИТЕЛНИТЕ ПРИЗНАЦИ

С вкус на плодове | _____ →

Вкус на зелен плод ☐ Вкус на зрял плод ☐

Горчив | _____ →

Стипчив | _____ →

Име на дегустатора:

Код на пробата:

Дата:

Забележки:

▼ **M22***Допълнение Б***МЕТОД ЗА ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА МЕДИАНАТА И НА ДОВЕРИТЕЛНИТЕ ИНТЕРВАЛИ****Медиана**

$$Me = [P(X < X_m) \leq 1/2 \wedge P(X \leq X_m) \geq 1/2]$$

Медианата се определя като реалното число X_m , което се характеризира с факта, че вероятността (P) разпределените стойности (X) да са по-ниски от въпросното число (X_m) е по-малка или равна на 0,5 и че в същото време вероятността (P) разпределените стойности (X) да са по-ниски или равни на X_m е по-голяма или равна на 0,5. Според друго определение за медиана се приема 50-ия процентил на нарастваща редица от числа. С други думи, медианата представлява стойността посредата на подредена редица с нечетен брой стойности или пък средноаритметичното на двете стойности в средата на подредена редица с четен брой стойности.

Стабилно отклонение

За да се получи достоверна оценка на отклонението от медианата, трябва да се използва оценка на стабилното отклонение по Stuart и Kendall. Следната формула показва асимптотичното отклонение, т.е. стабилната оценка на отклонението на разглежданите данни, където N е броят наблюдения и IQR — интерквартилният размах, който обхваща точно 50 % от случаите при разпределение с дадена вероятност.

$$S^* = \frac{1,25 \text{ IQR}}{1,35 \sqrt{N}}$$

Изчисляването на интерквартилният размах се осъществява чрез изчисляване на величината на отклонение между 75-ия и 25-ия процентил.

$$IQR = 75\text{-и процентил} - 25\text{-и процентил}$$

Процентилът е стойността X_{pc} , която се характеризира с факта, че вероятността (P) разпределените стойности да са по-ниски от X_{pc} е по-малка или равна на определена стотна и че в същото време вероятността (P) разпределените стойности да са по-ниски или равни на X_{pc} е по-голяма или равна на същата стотна. Стотната указва използваната част от разпределението. В случая с медианата тя е равна на 50/100.

$$\text{Процентил} = \left[P(X < X_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge P(X \leq X_{pc}) \geq \frac{n}{100} \right]$$

В практиката процентилът е стойността на разпределение, отговаряща на определена област, очертана от кривата на разпределението или на плътността. Например 25-ия процентил представлява стойността на разпределение, отговаряща на област, равна на 0,25 или 25/100.

Стабилен коефициент на отклонение

Стабилният коефициент на отклонение представлява чисто число, т.е. без мерна единица, което указва процентът на отклонение на редицата от анализирани числа. Поради тази причина този коефициент е много удобен за проверка на достоверността на работата на членовете на групата.

$$rVC\% = \frac{S^*}{Me} 100$$

▼ M22**Доверителни интервали от 95 % на медианата**

Доверителните интервали от 95 % (стойност на грешката от първи род, равна на 0,05 или 5 %) представляват интервалите, в които стойността на медианата може да се променя при хипотеза, че ще бъде възможно опитът да бъде повторен неограничен брой пъти. В практиката този интервал указва интервала на отклонение при опита при едни и същи условия на изпитване при хипотеза, че ще бъде възможно опитът да бъде повторен неограничен брой пъти. Интервалът помага да се оцени, както и в случая със стабилния коефициент на отклонение, достоверността на опита.

$$IC_{sup} = Me + (c.S^*)$$

$$IC_{inf} = Me - (c.S^*)$$

Където c , в случай на доверителен интервал от 0,95, е равно на 1,96.

▼ M20

▼ M19

*ПРИЛОЖЕНИЕ XV***1. МАСЛЕНО СЪДЪРЖАНИЕ НА ОСТАТЪЧНИЯ МАТЕРИАЛ****1.1. Апаратура**

- подходящ за екстракция апарат, снабден с 200- до 250-милилитрова колба с кръгло дъно,
- баня (например пясъчна баня, водна баня) с електрическо подгряване или котлон,
- аналитична везна,
- пещ, регулирана до максимум 80 °C,
- пещ с електрическо подгряване, снабдена с термостатично устройство, регулирано до 103 ± 2 °C, и такава, че да може да се почиства с въздушна струя или да работи при понижено налягане,
- механична мелница, лесна за почистване, и такава, че да позволява смилането на маслинените остатъци без повишаване на тяхната температура или каквото и да било значително изменение в тяхното водно съдържание, летливи вещества или вещества, които могат да се екстрахират с хексан,
- екстракционна гилза и памук или филтърна хартия, от които веществата, които могат да се екстрахират с хексан, вече са били отстранени,
- десикатор,
- сито с диаметър на отворите 1 mm,
- малки частици от предварително изсушена пемза.

1.2. Реактив

Нормален хексан за технически цели, който след пълно изпаряване трябва да има остатък от по-малко от 0,002 g на 100 ml.

2. ХОД НА ОПИТА**2.1. Подготовка на опитната проба**

Ако е необходимо се използва механичната мелница, която е била добре почиствена предварително, за смятане на лабораторната проба с оглед на раздробяването ѝ до частици, които да могат напълно да преминават през ситото.

Използва се една двадесета от пробата за завършване на процеса по почистване на мелницата, раздробеният материал се отстранява, остатъкът се смила и събира, смесва се внимателно и се анализира незабавно.

2.2. Размер на пробата

Веднага след извършването на операцията по смятане, се измерват около 10 g от пробата с точност до 0,01 g за извършване на опита.

2.3. Подготовка на екстракционната гилза

Поставя се частта от пробата в гилзата и се запущва с памук. Ако се използва филтърна хартия, частта от пробата се обвива в нея.

2.4. Предварително изсушаване

Ако остатъците от преработката на маслини са много влажни (т.е. съдържанието на влага и летливи вещества е повече от 10 %), се извършва предварително изсушаване чрез поставяне на заредената гилза (или филтърна хартия) в нагрятата пещ за подходящо време при не повече от 80 °C с оглед на намаляването на съдържанието на влага и летливи вещества до по-малко от 10 %.

▼B**2.5. Подготовка на колбата с кръгло дъно**

Претегля се с точност до 1 mg колбата, съдържаща една или две частици пемза, предварително изсушена в пещта при 103 ± 2 °C и след това охладена в десикатор за не по-малко от един час.

2.6. Първоначална екстракция

В апарата за екстракция се поставя гилзата (или филтърната хартия), съдържаща частта от пробата. Налива се в колбата необходимото количество хексан. Свързва се колбата с апарата за екстракция и цялата система се поставя в банята с електрическо подгряване. Настроява се скоростта на подгряване по такъв начин, че скоростта на оросяване да не е по-малка от три капки за секунда (средно, не силно кипене). След екстракция в продължение на четири часа, се оставя да се охлади. Гилзата се отстранява от апарата за екстракция и се поставя под въздушна струя с оглед на издухване на влагата от импрегниращия разтворител.

2.7. Повторна екстракция

Изтърсва се съдържанието на гилзата в миксер и се смила възможно най-фино. Връща се смляната смес в гилзата без загуби и тя се поставя отново в апарата за екстракция.

Екстракцията се продължава за още два часа, като се използва същата колба с кръгло дъно, която съдържа първоначалния екстракт.

Полученият разтвор в екстракционната колба трябва да е бистър. Ако не е, се филтрира през филтърна хартия, а колбата, в която е бил, и филтърната хартия се промиват няколко пъти с хексан. Филтратът и промивният разтворител се събират в друга колба с кръгло дъно, която е била изсушена и тарирана с точност до 1 mg.

2.8. Премахване на разтворителя и претегляне на екстракта

По-голямата част от разтворителя се премахва чрез дестилация в баня с електрическо подгряване. Последните следи от разтворителя се премахват чрез нагряване на колбата в пещта при 103 ± 2 °C за 20 минути. Процесът на елиминация се подпомага или чрез продухване с въздух, или за предпочитане с инертен газ, през определени периоди от време, или чрез използването на ниско налягане.

Колбата се поставя в десикатор за охлаждане за поне един час и се претегля с точност до 1 mg.

Нагрява се отново в продължение на 10 минути при същите условия, охлажда се в десикатор и се претегля.

Разликата между двете измервания не трябва да превишава 10 mg. Ако превишава, се нагрява отново за периоди от 10 минути, последвани от охлаждане и претегляне докато разликата в теглата стане 10 mg или по-малко. Отбелязва се последното тегло на колбата.

Провеждат се дублиращи определяния на опитната проба.

3. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**3.1. Метод за изчисляване и формула**

а) Екстрактът, изразен в проценти от масата на продукта, според получените резултати, е равен на:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0},$$

▼B

където: S е процентът от масата на продукта, според получените резултати,

m_0 = е масата, в грамове, на частта от пробата,

m_1 = е масата, в грамове, на екстракта след изсушаването.

За резултат се взема средното аритметично от дублиращите определяния, като се предвижда повтораемостта на условията да е задоволителна.

Резултатът се изразява до една цифра след десетичната запетая.

- б) Резултатът се изразява спрямо сухото вещество чрез използването на формулата:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{масления процент на екстракта спрямо сухото вещество,}$$

където:

S = е процентът на екстракта спрямо продукта, според получените резултати (виж буква а)),

U = е неговото съдържание на влажност и летливи вещества.

3.2. Повторяемост

Разликата между едновременно или бързо едно след друго проведените от същия аналитик дублиращи определяния не трябва да превишава 0,2 g хексанов екстракт на 100 g от пробата.

Ако това условие не е удовлетворено, анализът се повтаря с други две опитни части. Ако и в този случай разликата превишава 0,2 g, за резултат се приема средното аритметично от четирите определяния.



ПРИЛОЖЕНИЕ XVI

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЙОДНОТО ЧИСЛО

1. ОБХВАТ

Настоящият Международен стандарт определя метод за определянето на йодното число на животинските и растителни мазнини и масла, наричани по-долу мазнини.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

За целите на Международния стандарт се прилага следното определение:

- 2.1. *йодно число*. Масата на абсорбирания от пробата йод при условията на работа, определени в настоящия Международен стандарт.

Йодното число се изразява в грамове йод на 100 g от пробата.

3. ПРИНЦИП

Разтварянето на част от пробата в разтворител и добавяне на реактива на Вийс. След определено време, добавяне на разтвор на калиев йодид и вода и титруване с разтвор на натриев тиосулфат.

4. РЕАКТИВИ

Всички реактиви трябва да са с признато за аналитични цели качество:

- 4.1. *вода*, в съответствие с изискванията на ISO 3696, Качество 3.
- 4.2. *калиев йодид*, разтвор от 100 g/l, който не съдържа йодат или свободен йод.
- 4.3. *скорбяла*, разтвор.
- Смесват се 5 g разтворима скорбяла с 30 ml вода, тази смес се прибавя към 1 000 ml кипяща вода, вари се в продължение на три минути и се оставя да се охлади.
- 4.4. *натриев тиосулфат*, стандартен волуметричен разтвор с $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, стандартизиран не повече от седем дни преди употреба.
- 4.5. *разтворител*, приготвен чрез смесването на равни обеми циклохексан и оцетна киселина.
- 4.6. *реактив на Вийс*, съдържащ йоден монохлорид в оцетна киселина. Следва да се използва реактив на Вийс от търговската мрежа.

5. АПАРАТУРА

Обикновена лабораторна апаратура и, по-специално, следното:

- 5.1. *стъклени мерителни лъжички*, подходящи за частта от пробата и за поставяне в колбите (5.2.).
- 5.2. *ерленмайерови колби*, с вместимост 500 ml, снабдени със запушалки от шлифовано стъкло и напълно сухи.

6. ПОДГОТОВКА НА ПРОБАТА

Хомогенизираната проба се подсушава върху натриев сулфат и се филтрира.

7. ХОД НА ОПИТА

7.1. Част от пробата

Масата на частта от пробата варира в зависимост от очакваното йодно число, както е показано в таблица 1.

▼ B

Таблица 1

Очаквано йодно число	Маса на пробата (g)
по-малко от 5	3,00
5 до 20	1,00
21 до 50	0,40
51 до 100	0,20
101 до 150	0,13
151 до 200	0,10

Тегло на пробата с точност до 0,1 mg в стъклена мерителна чашка (5.1)

7.2. Определяне

Пробата се поставя в колба от 500 ml (6.2.). Добавя се 20 ml Разтвор (4.5), за да се разтворят мазнините. Добавят се точно 25 ml от реактива на Вийс (4.6.), слага се запушалка, разклаща се съдържанието и колбата се поставя на тъмно. Не се използва пипета за устно подаване за реактива на Вийс.

По същия начин се приготвя празна проба с разтворител и реактив, без изпитна проба.

Проби, които имат йоден клапан под 150, колбите се оставят на тъмно за един час; за тези с йоден клапан над 150 и за полимеризирани продукти или продукти, окислени в значителна степен, се оставят за два часа.

Към края се добавя 20 ml калиево-йоден разтвор (4.2.) и 150 ml вода (4.1.) към всяка колба.

Титрува се с стандартен обемен разтвор от содиев триофосфат (4.4.), докато жълтият цвят дължащ се на йода почти изчезне. Добавят се няколко капки от разтвор на скорбяла (4.3.) и титруването продължава, докато синият цвят изчезне след енергично разклащане.

Бележка: Допуска се потенциометрично определяне в крайната точка.

7.3. Брой на определянията

Правят се две определяния на същата проба.

8. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТА

Йодният клапан се изразява чрез израза

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

където:

c = е цифровата стойност на точната концентрация, в мол на литър, на използвания стандартен обемен содиев триофосфатен разтвор (4.4.).

V₁ = е цифровата стойност на обема, в милилитри, на стандартния обемен содиев триофосфатен разтвор (4.4.), използван за празната проба.

▼ B

V_2 = е цифровата стойност на обема в милилитри, на стандартния обменен натриев трифосфатен разтвор (4.4.), използван при определянето

m = е цифровата стойност на масата, в грамове от пробата (7.1.).

Като резултат се отчита средно аритметично от двете определяния, при условие че изискването за повторяемост (9.2.) е спазено.

▼ **M11***ПРИЛОЖЕНИЕ XVII***МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СТИГМАСТАДИЕНИ В РАСТИТЕЛНИ МАСЛА****1. ЦЕЛ**

Определяне на стигмастадиени в растителни масла, съдържащи ниски концентрации на тези въглеводороди и по-специално в необработеното маслиново масло (virgin) и в суровото маслиново масло от остатъчен материал.

2. ОБХВАТ

Стандартът може да се прилага за всички растителни масла, въпреки че измерванията са надеждни само когато съдържанието на тези въглеводороди е между 0,01 и 4,0 мг/кг. Методът е особено подходящ за откриване на наличие на рафинирани растителни масла (от маслини, остатъчен материал, слънчоглед, палмови ядки и т.н.) в необработеното маслиново масло (virgin), тъй като рафинираните масла съдържат стигмастадиени, а необработеното маслиново масло не съдържа такива вещества.

3. ПРИНЦИП

Изолиране на неосапунващи се съединения. Отделяне на стероидна въглеводородна фракция посредством колбена хроматография върху силициев гел и анализ посредством капилярна газова хроматография.

4. АПАРАТУРА

- 4.1. Епруветки 250 мл, подходящи за употреба с кондензатор с обратно оттичане.
- 4.2. Отделителни фунии с капацитет 500 мл.
- 4.3. Шишета с кръгло дъно и вместимост 100 мл.
- 4.4. Ротационен изпарител.
- 4.5. Стъклена хроматографска колба (с вътрешен диаметър от 1,5 до 2,0 см и височина 50 см) с тефлоново разклонение и запушалка от стъклена влакнеста вата или диск от синтеровано стъкло на дъното. За да се подготви колбата от силициев гел, се налива хексан в хроматографската колба до дълбочина приблизително 5 см и след това се напълва с каша от силициев гел в хексан (15 грама в 40 мл), с помощта на части от хексан. Изчаква се да се утаи и се довършва утаяването с прилагане на лека вибрация. Добавя се анхидриден натриев сулфат до височина приблизително 0,5 см и накрая се отмива излишният хексан.
- 4.6. Газов хроматограф с детектор на пламъкова йонизация, монтиран на колоната разделен или студен инжектор и пещ с възможност за програмиране в рамките на ± 1 °C.
- 4.7. Капилярна колба от разтопен силиций за газова хроматография (с вътрешен диаметър от 0,25 до 0,32 мм на дължина 25 м), покрита с 5-процентна фаза от фенилметилсиликон, с дебелина на слоя 0,25 мм.

Забележка 1:

Могат да се използват други колби с аналогична или по-ниска полярност.

- 4.8. Интегриращо и регистриращо устройство с възможност за интегриране на базова линия-базова линия.
- 4.9. Микроспринцовка от 5 до 10 мл за газова хроматография с циментирана игла.
- 4.10. Електрическа пещ или котлон.

▼ M11**5. РЕАГЕНТИ**

Всички реагенти са с качество на анализи, освен ако не е посочено друго. Използва се дестилирана вода или вода с поне еквивалентна чистота.

- 5.1. Хексан или смес от алкани с интервал на точката на завиране от 65 до 70 °C, дестилирани с изправителна колона.

Забележка 2:

Разтворителят се дестилира, за да се отстранят страничните примеси.

- 5.2. 96 v/v (обемни части) етанол.

- 5.3. Обезводнен натриев сулфат

- 5.4. Алкохолен разтвор на калиев хидроокис на 10 %. Добавете 10 мл вода към 50 г калиев хидроокис, разбъркайте и след това разтворете сместа в етанол до 500 мл.

Забележка 3:

Алкохолният поташ става кафяв при престояване. Той се приготвя ежедневно и се пази в добре запушени шишета от тъмно стъкло.

- 5.5. Силициев гел 60 за колонна хроматография, от 70 до 230 отвори на ситото (Мерк, референция № 7734 или сходна).

Забележка 4:

Обикновено силициевият гел може да се използва директно от контейнера, без каквато и да било обработка. Някои партии силициев гел могат обаче да покажат ниска активност в резултат на лошо хроматографско сепариране. При това обстоятелство силициевият гел се обработва по следния начин: Активира се силициевият гел посредством загряване в продължение на минимум четири часа при температура 550 °C. След загряването силициевият гел се поставя в сушилен шкаф, докато се охлади и след това се прехвърля в епруветка със запушалка. Добавят се 2 % вода и се разклаща, докато вече не се виждат бучки и прахът се движи свободно.

Ако партидите силициев гел доведат до хроматограми с неправилни пикове, силициевият гел се обработва така, както е указано по-горе. Като алтернатива може да се използва изключително чист силициев гел (Мерк, референция № 7754).

- 5.6. Изходен разтвор (200 ppm) на холеста-3,5-диен (Сигма, 99 % чистота) в хексан (10 мг в 50 мл).

- 5.7. Стандартен разтвор на холеста-3,5-диен хексан с концентрация 20 ppm, получен с разреждане на горния разтвор.

Забележка 5:

Разтворите 5.6 и 5.7 са стабилни за период от минимум четири месеца, ако се пазят при температура под 4 °C.

- 5.8. Разтвор на п-нонакозан в хексан с концентрация приблизително 100 ppm.

- 5.9. Газ-носител за хроматографията: хелий или водород с чистота 99,9990 %.

- 5.10. Помощни газове за детектора на пламъчна йонизация: водород с чистота 99,9990 % и пречистен въздух.

▼ **M11****6. ПРОЦЕДУРА****6.1. Подготовка на неосапунващи се материи**

- 6.1.1. Претеглете $20 \pm 0,1$ г масло в шише с вместимост 250 мл (4.1), добавете 1 мл стандартен разтвор на холеста-3,5-диен (20 микрограма) и 75 мл 10-процентен алкохолен поташ (калиев карбонат), поставете обратния хладник и нагрейте до леко кипене в продължение на 30 минути. Отстранете шишето, съдържащо мострата, от нагревателя и оставете разтвора леко да се охлади (не оставяйте да се охлади напълно, тъй като мострата ще се утаи). Добавете 100 мл вода и прехвърлете разтвора в сепарираща фуния (4.2) с помощта на 100 мл хексан. Разклащайте силно сместа в продължение на 30 секунди и оставете да се сепарира.

Забележка 6:

Ако се получи емулсия, която не изчезва бързо, се добавят малки количества етанол.

- 6.1.2. Прехвърлете водната фаза отдолу във втора сепарираща фуния и извлекете отново със 100 мл хексан. Остава се долната фаза да изтече още веднъж и се промиват три пъти екстрактите от хексан (комбинирано в друга отделяща фуния), като всеки път се използват 100 мл смес от етанол и вода (1:1), докато бъде достигната фаза с неутрално рН.

- 6.1.3. Прокарва се хексановият разтвор през анхидриден натриев сулфат (50 г), промива се с 20 мл хексан и се изпарява в ротационен изпарител при температура 30 °C при намалено налягане, докато изсъхне.

6.2. Отделяне на фракция от стероиден въглеводород

- 6.2.1. Взема се остатъкът в колбата за фракциониране с помощта на две части по 1 мл хексан, прокарва се пробата по колбата, като се оставя нивото на разтвора да падне до максимума на натриевия сулфат и се започва хроматографското елюиране с хексан с приблизителна скорост на потока 1 мл/мин. Изхвърлят се първите 25 до 30 мл елюат и след това се взема следващата фракция от 40 мл. След това взетата фракция се слага в епруветка с кръгло дъно и вместимост 100 мл (4.3).

Забележка 7:

Първата фракция съдържа наситените въглеводороди (фигура 1a), а втората фракция – стероидните. По-нататъшното елюиране дава сквален и свързани с него съставки. За да се постигне добро сепариране между наситените и стероидните въглеводороди, е необходимо да се оптимизират обемите на фракциите. За целта обемът на първата фракция се регулира така, че когато се анализира втората фракция максимумите, представляващи наситените въглеводороди, да са ниски (виж фигура 1b); ако те не се появят, а интензитетът на стандартния максимум е нисък, трябва да се намали обемът. Във всеки случай, пълното сепариране между компонентите на първата и втората фракция е излишно; тъй като не се получава припокриване на максимумите през време на анализа на GC, ако условията на GC се регулират по начина, посочен в 6.3.1. Оптимизацията на обема на втората фракция, ако втората фракция по принцип не е необходима като добра сепарация, става със следващите компоненти. Въпреки това обаче, присъствието на голям максимум при време на задържане по-малко с около 1,5 минути спрямо стандартното се дължи на сквалена и е показател за лоша сепарация.

- 6.2.2. Изпарете втората фракция в ротационен изпарител при температура 30 °C при намалено налягане, докато изсъхне и незабавно разтворете остатъка в 0,2 мл хексан. Запазете разтвора в хладилник до анализа.

Забележка 8:

Остатъци 6.1.3 и 6.2.2 не трябва да се държат в сухо състояние и при стайна температура. Веднага щом бъдат получени, се добавя разтворът и разтворите се пазят в хладилник.

▼ **M11****6.3. Газова хроматография****6.3.1. Работни условия за разделено инжектиране:**

- температура на инжектора: 300 °C,
- температура на детектора: 320 °C,
- интегратор-регистратор: параметрите за интегриране се определят по такъв начин, че да дадат правилна оценка на зоните. Препоръчваме метод на интегриране „базова линия-базова линия“,
- чувствителност: приблизително 16 пъти от минималната чувствителност,
- количество инжектиран разтвор: 1 микролитър,
- пещ с възможност за програмиране на температурите: първоначално 235 °C в продължение на шест минути и след това увеличение с 2 °C/минута, докато се достигнат 285 °C,
- инжектор с делител на потока 1:15,
- носител: хелий или водород с налягане около 120 кПа.

Тези условия могат да се регулират според характеристиката на хроматографа и колоната, така че да се получат хроматограми, отговарящи на следните изисквания: вътрешен стандартен максимум в рамките на около пет минути от времето, посочено в 6.3.2; вътрешният стандартен максимум трябва да е минимум 80 % от пълния мащаб.

Системата за газова хроматография се проверява, като се инжектира смес от изходен разтвор на холестадиен (5.6) и разтвор на п-нонакозан (5.8). Максимумът на холеста-3,5-диена трябва да се появи преди п-нонакозана (фигура 1в); ако това не стане, могат да се предприемат две действия: да се намали температурата на пещта и/или да се използва по-малко полярна колона.

6.3.2. Идентификация на максимума

Вътрешният стандартен максимум се появява след около 19 минути, а 3,5-стигмастидиенът – след относително време на задържане от около 1,29 минути (виж фигура 1б). 3,5-стигмастидиенът се получава с малки количества изомер и обикновено двете вещества се елюират заедно като един-единствен хроматографен максимум. Въпреки това обаче, ако колоната е твърде полярна или има висока разделителна способност, изомерът може да се появи като малък максимум преди и близко до този на стигмаста-3,5-диена (фигура 2). За да се гарантира, че стигмастидиените се елюират като един максимум, бихме препоръчали да замените колоната или с такава, която е по-малко полярна, или има по-голям вътрешен диаметър.

Забележка 9:

Сравнителни стигмастидени можете да получите от анализа на рафинирано зеленчуково масло, като използвате по-малко количество мостра (1 до 2 грама). Стигмастидиените дават очевиден и лесно определяем максимум.

6.3.3. Количествен анализ

Съдържанието на стигмастидени се определя по следната формула:

$$\text{мг/кг стигмастидени} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o},$$

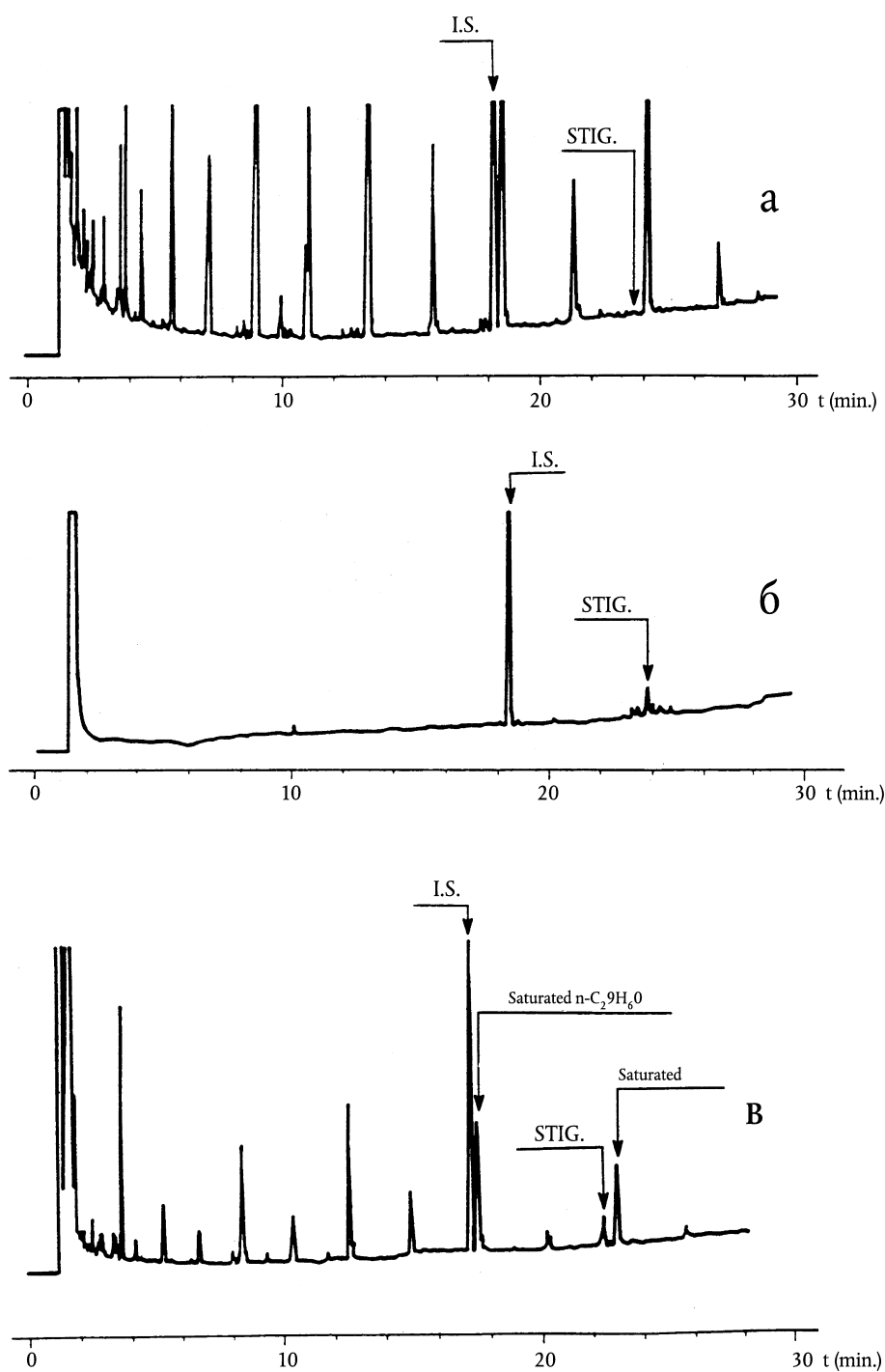
▼ M11

където:

A_s	=	зона на максимума на стигмастадиените (ако максимумът е решен в два изомера, сумирайте зоните на двата максимума),
A_c	=	зона на вътрешния стандарт (холестадиен),
M_c	=	маса на добавения стандарт, в микрограмове,
M_o	=	маса на взетото масло, в грамове.

Граница на откриване: около 0,01 мг/кг.

▼ M11

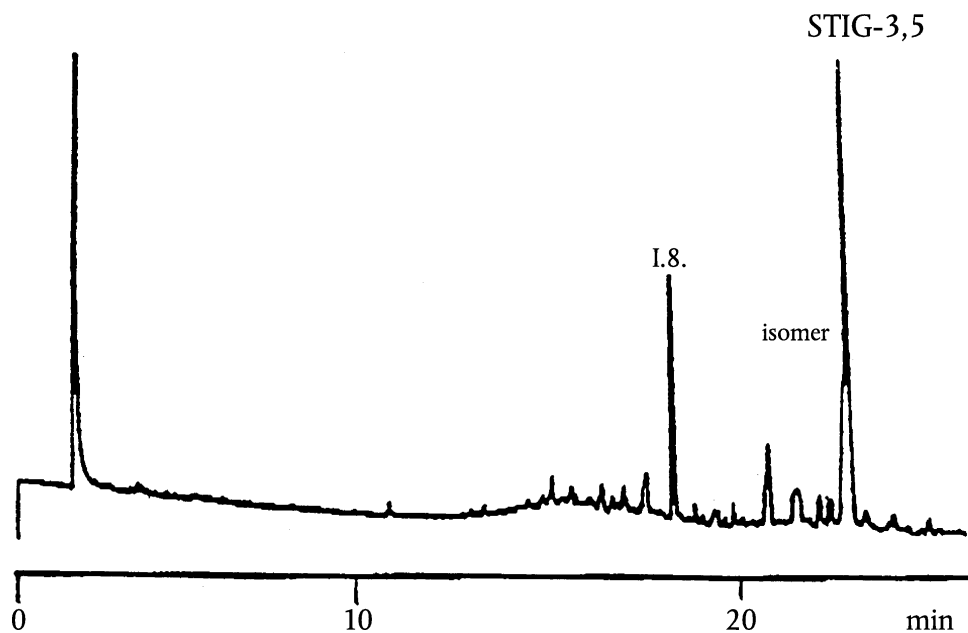


Фигура 1

Газови хроматограми, получени от мостри на маслиново масло, анализирани на капилярна колона от стопен силиций (вътрешен диаметър 0,25 мм на 25 м), покрити с фенилметилсиликон 5 %, дебелина на слоя 0,25 микрометра.

▼ **M11**

- а) Първа фракция (30 мл) от необработено маслиново масло, с пръски от стандартно маслиново масло.
- б) Втора фракция (40 мл) от маслиново масло, съдържащ 0,10 мг/кг стигмастидени.
- в) Втора фракция (40 мл), съдържаща малка част от първата фракция.

**Фигура 2**

Газова хроматограма, получена от мостра на рафинирано маслиново масло, анализирана на колона DB-5, показваща изомера на 3,5-стигмастидена.

▼ **M13***ANNEX XVIII***DETERMINATION OF TRIACYLGLYCEROLS WITH ECN 42
(DIFFERENCE BETWEEN HPLC DATA AND THEORETICAL
CONTENT)****1. Scope**

Determination of the composition of triacylglycerols (TAGs) in olive oils, in terms of their equivalent carbon number by differences between the analytical results obtained by high performance liquid chromatography (HPLC) and the theoretical content, calculated starting from the fatty acid composition.

2. Field application

The standard is applicable to olive oils. The method is applicable to the detection of the presence of small amounts of seed oils (rich in linoleic acid) in every class of olive oils.

3. Principle

The content of triacylglycerols with ECN42 determined by HPLC analysis and the theoretical content of triacylglycerols with ECN42 (calculated on the basis of GLC determination of fatty acid composition) correspond within a certain limit for pure oils. A difference larger than the values stated in the Regulation for each type of oil points out that the oil contains seed oils.

4. Method

The method for calculation of theoretical content of triacylglycerols with ECN42 and of the difference between the HPLC data and this one essentially is made by the coordination of analytical data obtained by means of other methods: it is possible to distinguish three phases: determination of fatty acid composition by capillary gas chromatography, calculation of theoretical composition of triacylglycerols with ECN42, HPLC determination of ECN42 triacylglycerols

4.1. Apparatus

- 4.1.1. Round bottom flasks, 250 and 500 ml.
- 4.1.2. Beakers 100 ml.
- 4.1.3. Glass chromatographic column, 21 mm internal diameter, 450 mm length, with cock and normalized cone (female) at the top.
- 4.1.4. Separator funnels, 250 ml, with normalized cone (male) at the bottom, suitable to be connected with the top of the column.
- 4.1.5. Glass rod, 600 mm length.
- 4.1.6. Glass funnel, 80 mm diameter.
- 4.1.7. Volumetric flasks, 50 ml.
- 4.1.8. Volumetric flasks, 20 ml.
- 4.1.9. Rotative evaporator.
- 4.1.10. High performance liquid chromatography, allowing thermostatic control of column temperature.
- 4.1.11. Injection units for 10 µl delivery.
- 4.1.12. Detector: differential refractometer. The full scale sensitivity should be at least 10^{-4} units of refractive index.

▼ M13

4.1.13. Column: stainless steel tube 250 mm length and 4,5 mm internal diameter packed with 5 µm diameter particles of silica with 22 to 23 % carbon in the form of octadecylsilane (note 2).

4.1.14. Recorder and/or integrator.

4.2. Reagents

The reagents should be of analytical purity. Elution solvents should be de-gassed, and may be recycled several times without effect on the separations.

4.2.1. Petroleum ether 40 to 60 °C chromatographic grade.

4.2.2. Ethyl ether, peroxides free, freshly distilled.

4.2.3. Glass chromatographic elution solvent: mixture petroleum ether/ethyl ether 87/13 (v/v).

4.2.4. Silicagel, 70-230 mesh, type Merck 7734, with water content standardized at 5 % (w/w).

4.2.5. Glass wool.

4.2.6. Acetone.

4.2.7. Acetonitrile.

4.2.8. HPLC elution solvent: acetonitrile + acetone (proportions to be adjusted to obtain the desired separation; begin with 50:50 mixture).

4.2.9. Solubilization solvent: acetone.

4.2.10. Reference triglycerides commercial triglycerides tripalmitin, triolein, etc.) may be used and the retention times thence plotted in accordance with the equivalent carbon number, or alternatively reference chromatograms obtained from soya oil, mixture 30:70 soya oil/olive oil and pure olive oil (see notes 3 and 4 and figure 1, 2, 3, 4).

4.3. Sample preparation

As a number of interfering substances can rise false positive results, the sample must always be purified according to IUPAC method 2.507, used for determination of polar substances in oxidised oils.

4.3.1. Chromatographic column preparation

Fill the column (4.1.3) with about 30 ml of elution solvent (4.2.3), then introduce inside the column some glass wool (4.2.5) pushing it to the bottom of the column by means of the glass rod (4.1.5).

In a 100 ml beaker, suspend 25 g of silicagel (4.2.4) in 80 ml of elution mixture (4.2.3), then transfer it inside the column, by means of a glass funnel (4.1.6).

To ensure the complete transfer of silicagel inside the column, wash the beaker with the elution mixture and transfer the washing portions inside the column, too.

Open the cock and let solvent elute from the column until its level is about 1 cm over the silicagel.

▼M13**4.3.2. Column chromatography**

Weigh with the accuracy of 0,001 g, $2,5 \pm 0,1$ g of oil, previously filtered, homogenized and anhydriified, if necessary, in a 50 ml volumetric flask (4.1.7). Solve it in about 20 ml of elution solvent (4.2.3), if necessary, slightly heat it to make the dissolution easily. Cool at room temperature and adjust the volume with elution solvent.

By means of a volumetric pipette, introduce 20 ml of solution inside the column prepared according to 4.3.1, open the cock and let solvent elute to the silicagel layer level.

Then elute with 150 ml of elution solvent (4.2.3), adjusting the solvent rate at about 2 ml/min (150 ml will take about 60 to 70 minutes to pass through the column).

The eluated is recovered in a 250 ml round bottom flask (4.1.1) previously tared in an oven and exactly weighted. Eliminate solvent at reduce pressure (Rotavapor) and weigh the residue that will be used to prepare the solution for HPLC analysis and for methyl ester preparation.

The sample recovery from the column must be 90 % at least for extra virgin, virgin, ordinary refined and olive oil categories, and a minimum of 80 % for lampante and residue olive oils.

4.4. HPLC analysis**4.4.1. Preparation of the samples for chromatographic analysis**

A 5 % solution of the sample to be analysed is prepared by weighing $0,5 \pm 0,001$ g of the sample into a 10 ml graduated flask and making up to 10 ml with the solubilization solvent (4.2.9).

4.4.2. Procedure

Set up the chromatographic system. Pump elution solvent (4.2.8) at a rate of 1,5 ml/min to purge the entire system. Wait until a stable base line is obtained. Inject 10 μ l of the sample prepared as in 4.3.

4.4.3. Calculation and expression of results

Use the area normalization method, i.e. assume that the sum of the areas of the peaks corresponding to TAGs from ECN42 up to ECN52 is equal to 100 %. Calculate the relative percentage of each triglyceride using the formula:

% triglyceride = area of peak $\times$ 100 / sum of peak areas.

The results are to be given to within at least two decimal places.

Note 1: The elution order can be determined by calculating the equivalent carbon numbers, often defined by the relation $ECN = CN - 2n$, where CN is the carbon number and n is the number of double bounds, it can be calculated more precisely by taking into account the origin of the double bond. If n_o , n_l and n_{ln} are the numbers of double bonds attributed to oleic, linoleic and linolenic acids respectively, the equivalent carbon number can be calculated by means of the relation of the formula:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln},$$

▼ **M13**

where the coefficient d_o , d_l and d_{ln} can be calculated by means of the reference triglycerides. Under the conditions specified in this method, the relation obtained will be close in:

$$ECN = CN - (2,60 \ n_o) - (2,35 \ n_l) - (2,17 \ n_{ln})$$

Note 2: Examples: Lichrosorb (Merck) RP 18 Art 50333
Lichrosphere or equivalent (Merck) 100 CH18 Art 50377.

Note 3: With several reference triglycerides, it is also possible to calculate the resolution with respect to triolein:

$$\alpha = RT' / RT \text{ triolein}$$

by use of the reduced retention time $RT' = RT - RT \text{ solvent}$.

The graph of $\log \alpha$ against f (number of double bonds) enables the retention values to be determined for all the triglycerides of fatty acids contained in the reference triglycerides — see figure 2.

Note 4: The efficiency of the column should permit clear separation of the peak of trilinolein from the peaks of the triglycerides with an adjacent RT. The elution is carried out up to ECN52 peak.

Note 5: A correct measure of the areas of all peaks of interest for the present determination is ensured if the second peak corresponding to ECN50 is 50 % of full scale of the recorder.

4.5. Calculation of triacylglycerols composition

4.5.1. Determination of fatty acid composition

Fatty acid composition is carried out by means of the EEC gas chromatographic method reported in Annex X A of Regulation (EEC) No 2568/91, by means of a capillary column. The methyl esters preparation is carried out according to Annex X B (sodium methylate alcohol solution).

4.5.2. Fatty acids for calculation

Glycerides are grouped by their equivalent carbon number (ECN), taking into account the following equivalencies between ECN and fatty acids. Only fatty acids with 16 and 18 carbon atoms were taken in consideration, because only these are important for olive oil.

Fatty acid (FA)	Abbreviation	Molecular weight (MW)	ECN
Palmitic acid	P	256,4	16
Palmitoleic acid	Po	254,4	14
Stearic acid	S	284,5	18
Oleic acid	O	282,5	16
Linoleic acid	L	280,4	14
Linolenic acid	Ln	278,4	12

▼M13

4.5.3. Conversion of area % into moles for all fatty acids

$$\left. \begin{aligned} \text{moles P} &= \frac{\% \text{ area P}}{\text{PM P}} & \text{moles S} &= \frac{\% \text{ area S}}{\text{PM S}} & \text{moles Po} &= \frac{\% \text{ area Po}}{\text{PM Po}} \\ \text{moles O} &= \frac{\% \text{ area O}}{\text{PM O}} & \text{moles L} &= \frac{\% \text{ area L}}{\text{PM L}} & \text{moles Ln} &= \frac{\% \text{ area Ln}}{\text{PM Ln}} \end{aligned} \right\} (1)$$

4.5.4. Normalization of fatty acids to 100 %

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% P(1,2,3)} &= \frac{\text{moles P} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% S(1,2,3)} &= \frac{\text{moles S} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% Po(1,2,3)} &= \frac{\text{moles Po} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% O(1,2,3)} &= \frac{\text{moles O} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% L(1,2,3)} &= \frac{\text{moles L} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% Ln(1,2,3)} &= \frac{\text{moles Ln} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \end{aligned} \right\} (2)$$

The result gives the percentage of each fatty acid in moles % in the overall (1,2,3-) position of the TAGs.

Then the sum of the saturated fatty acids P and S (SFA) and the unsaturated fatty acids Po, O, L and Ln (UFA) are calculated:

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% SFA} &= \text{moles \% P} + \text{moles \% S} \\ \text{moles \% UFA} &= 100 - \text{moles \% SFA} \end{aligned} \right\} (3)$$

4.5.5. Calculation of the fatty acid composition in 2- and 1,3- positions of TAGs

The fatty acids are distributed to three pools as follows: two identical for 1- and 3- positions and one for 2- position, with different coefficients for the saturated (P and S) and unsaturated acids (Po, O, L and Ln).

4.5.5.1. Saturated fatty acids in 2- position [P(2) and S(2)]

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% P(2)} &= \text{moles \% P (1,2,3)} * 0,06 \\ \text{moles \% S(2)} &= \text{moles \% S (1,2,3)} * 0,06 \end{aligned} \right\} (4)$$

▼ **M13**

4.5.5.2. Unsaturated fatty acids in 2- position [Po(2), O(2), L(2) and Ln(2)]:

$$\begin{aligned}
 \text{moles \% Po(2)} &= \frac{\text{moles \% Po(1, 2, 3)}}{\text{moles \% UFA}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)}] \\
 \text{moles \% O(2)} &= \frac{\text{moles \% O(1, 2, 3)}}{\text{moles \% UFA}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{mol \% S(2)}] \\
 \text{moles \% L(2)} &= \frac{\text{moles \% L(1, 2, 3)}}{\text{moles \% UFA}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)}] \\
 \text{moles \% Ln(2)} &= \frac{\text{moles \% Ln(1, 2, 3)}}{\text{moles \% UFA}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)}]
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

4.5.5.3. Fatty acids in 1,3-positions [P(1,3), S(1,3), Po(1,3) O(1,3), L(1,3) and Ln(1,3)]:

$$\begin{aligned}
 \text{moles \% P1,3} &= \frac{\text{moles \% P1,2,3} - \text{moles \% P(2)}}{2} + \text{moles \% P(1,2,3)} \\
 \text{moles \% S(1,3)} &= \frac{\text{moles \% S(1,2,3)} - \text{moles \% S(2)}}{2} + \text{moles \% S(1,2,3)} \\
 \text{moles \% Po(1,3)} &= \frac{\text{moles \% Po(1,2,3)} - \text{moles \% Po(2)}}{2} + \text{moles \% Po(1,2,3)} \\
 \text{moles \% O(1,3)} &= \frac{\text{moles \% O(1,2,3)} - \text{moles \% O(2)}}{2} + \text{moles \% O(1,2,3)} \\
 \text{moles \% L(1,3)} &= \frac{\text{moles \% L(1,2,3)} - \text{moles \% L(2)}}{2} + \text{moles \% L(1,2,3)} \\
 \text{moles \% Ln(1,3)} &= \frac{\text{moles \% Ln(1,2,3)} - \text{moles \% Ln(2)}}{2} + \text{moles \% Ln(1,2,3)}
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

4.5.6. Calculation of triacylglycerols

4.5.6.1. TAGs with one fatty acid (AAA, here LLL, PoPoPo)

$$\text{moles \% AAA} = \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% A(1,3)}}{10000}
 \tag{7}$$

4.5.6.2. TAGs with two fatty acids (AAB, here PoPoL, PoLL)

$$\begin{aligned}
 \text{moles \% AAB} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% B(1,3)} * 2}{10000} \\
 \text{moles \% ABA} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% B(2)} * \text{moles \% A(1,3)}}{10000}
 \end{aligned}
 \tag{8}$$

▼ **M13**

4.5.6.3. TAGs with three different fatty acids (ABC, here OLLn, PLLn, PoOLn, PPOLn)

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% ABC} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% B(2)} * \text{moles \% C(1,3)} * 2}{10000} \\ \text{moles \% BCA} &= \frac{\text{moles \% B(1,3)} * \text{moles \% C(2)} * \text{moles \% A(1,3)} * 2}{10000} \\ \text{moles \% CAB} &= \frac{\text{moles \% C(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% B(1,3)} * 2}{10000} \end{aligned} \right\} (9)$$

4.5.6.4. Triacylglycerides with ECN42

The following triglycerides with ECN42 are calculated according equation 7, 8 and 9 in order of expected elution in HPLC (normally only three peaks).

LLL

PoLL and the positional isomer LPoL

OLLn and the positional isomers OLnL and LnOL

PoPoL and the positional isomer PoLPo

PoOLn and the positional isomers OPoLn and OLnPo

PLLn and the positional isomers LLnP and LnPL

PoPoPo

SLnLn and the positional isomer LnSLn

PPoLn and the positional isomers PLnPo and PoPLn

The triacylglycerides with ECN42 are given by the sum of the nine triacylglycerols including their positional isomers. The results to be given with at least two decimal places.

5. Evaluation of the results

The calculated theoretical content and the content determined by the HPLC analysis are compared. If the difference between HPLC data minus theoretical data is greater than the values states for the appropriate oil category in the Regulation, the sample contains seed oil.

Note: Results are given to within one decimal figure.

6. Example (*The numbers refer to the sections in the text of the method*)

4.5.1. Calculation of moles % fatty acids from GLC data (area %)

The following data are obtained for the fatty acid composition by GLC:

FA	P	S	Po	O	L	Ln
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
area %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼M13

4.5.3. Conversion of area % into moles for all fatty acids

$$\text{moles P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles P} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{moles S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles S} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{moles Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles Po} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{moles O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles O} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{moles L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles L} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{moles Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ moles Ln} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{Total} = 0,35822 \text{ moles TAGs}$$

4.5.4. Normalization of fatty acids to 100 %

$$\text{moles \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 10,888\% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{moles \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 2,944\% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{moles \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,097\% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{moles \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 74,113\% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{moles \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 9,956\% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{moles \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,003\% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{Total moles \%} = 100,0 \%$$

Sum of the saturated and unsaturated fatty acids in the 1,2,3- position of TAGs

$$\text{moles \% SFA} = 10,888 \% + 2,944 \% = 13,831 \% \quad \text{See formula (3)}$$

$$\text{moles \% UFA} = 100,000 \% - 13,831 \% = 86,169 \% \quad \text{See formula (3)}$$

4.5.5. Calculation of the fatty acid composition in 2- and 1,3- positions of the TAGs

4.5.5.1. Saturated fatty acids in 2- position [P(2) and S(2)]

$$\text{moles \% P(2)} = 10,888 \% * 0,06 = 0,653 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (4)}$$

$$\text{moles \% S(2)} = 2,944 \% * 0,06 = 0,177 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (4)}$$

▼ **M13**

4.5.5.2. Unsaturated fatty acids in 1,3-position [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) and Ln(1,3)]

$$\text{moles \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 1,263 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (5)}$$

$$\text{moles \% O(2)} = \frac{74,113 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 85,295 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (5)}$$

$$\text{moles \% L(2)} = \frac{9,956 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 11,458 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (5)}$$

$$\text{moles \% Ln(2)} = \frac{1,003 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 1,154 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (5)}$$

4.5.5.3. Fatty acids in 1,3-positions [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) and Ln(1,3)]

$$\text{moles \% P(1,3)} = \frac{10,888 - 0,659}{2} 10,888 = 16,005 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

$$\text{moles \% S(1,3)} = \frac{2,944 - 0,177}{2} 2,944 = 4,327 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

$$\text{moles \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,263}{2} 1,097 = 1,015 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

$$\text{moles \% O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,295}{2} 74,113 = 68,522 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

$$\text{moles \% L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} 9,956 = 9,205 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

$$\text{moles \% Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} 1,003 = 0,927 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

4.5.6. Calculation of triacylglycerols

From the calculated fatty acid composition in sn-2- and sn-1,3- positions (see above):

FA in	1,3-pos.	2-pos.
P	16,005 %	0,653 %
S	4,327 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,263 %
O	68,522 %	85,295 %
L	9,205 %	11,458 %
Ln	0,927 %	1,154 %
Sum	100,0 %	100,0 %

the following triacylglycerols are calculated:

LLL

PoPoPo

PoLL with 1 positional isomer

SLnLn with 1 positional isomer

PoPoL with 1 positional isomer

▼ **M13**

PPoLn with 2 positional isomers

OLLn with 2 positional isomers

PLLn with 2 positional isomers

PoOLn with 2 positional isomers.

4.5.6.1. TAGs with one fatty acid (LLL, PoPoPo)

See formula (7)

$$\text{mol \% LLL} = \frac{9,205\% * 11,458\% * 9,205\%}{10000} = 0,09708 \text{ mol LLL}$$

$$\text{mol \% PoPoPo} = \frac{1,015\% * 1,263\% * 1,015\%}{10000} = 0,00013 \text{ mol PoPoPo}$$

4.5.6.2. TAGs with two fatty acids (PoLL, SLnLn, PoPoL)

See formula (8)

$$\text{mol \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015\% * 11,458\% * 9,205\% * 2}{10000} = 0,02141$$

$$\text{mol \% LPoL} = \frac{9,205\% * 1,263\% * 9,205\%}{10000} = 0,01070$$

0,03211 mol PoLL

$$\text{mol \% SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,327\% * 1,154\% * 0,927\% * 2}{10000} = 0,00093$$

$$\text{mol \% LnSLn} = \frac{0,927\% * 0,177\% * 0,927\%}{10000} = 0,00002$$

0,00095 mol SLnLn

$$\text{mol \% PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015\% * 1,263\% * 9,205\% * 2}{10000} = 0,00236$$

$$\text{mol \% PoLPo} = \frac{1,015\% * 11,458\% * 1,015\%}{10000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

4.5.6.3. TAGs with three different fatty acids (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)

See formula (9)

$$\text{mol \% PPoLn} = \frac{16,005\% * 1,263\% * 0,927\% * 2}{10000} = 0,00375$$

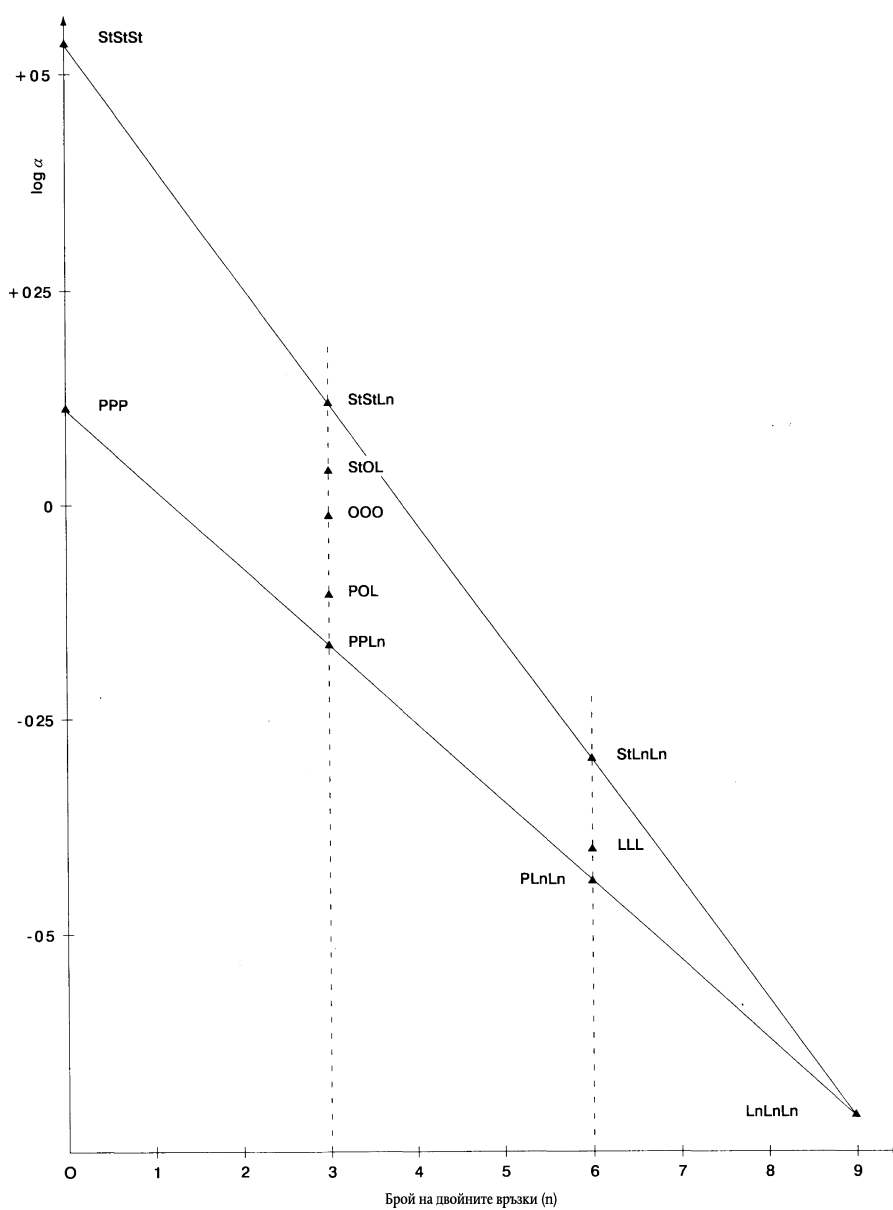
$$\text{mol \% LnPPo} = \frac{0,927\% * 0,653\% * 1,015\% * 2}{10000} = 0,00012$$

$$\text{mol \% PoLnP} = \frac{1,015\% * 1,154\% * 16,005\% * 2}{10000} = 0,00375$$

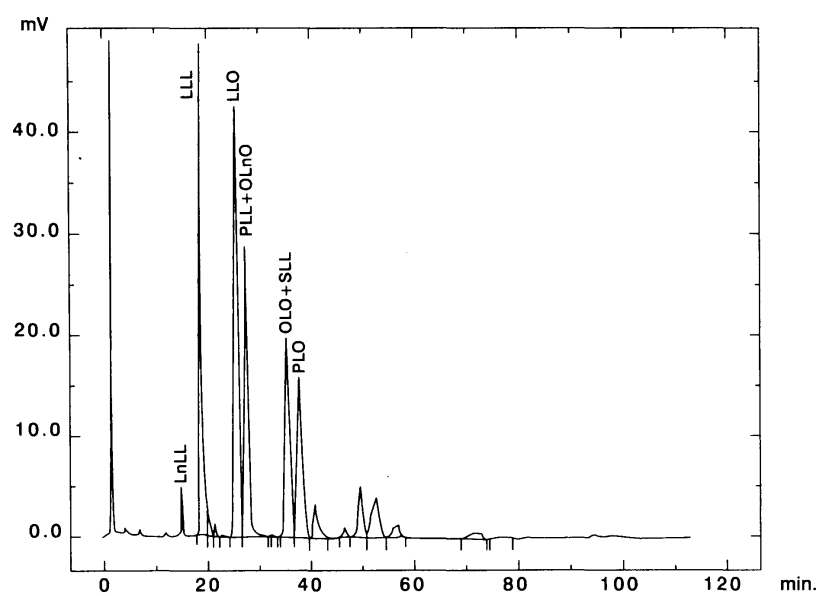
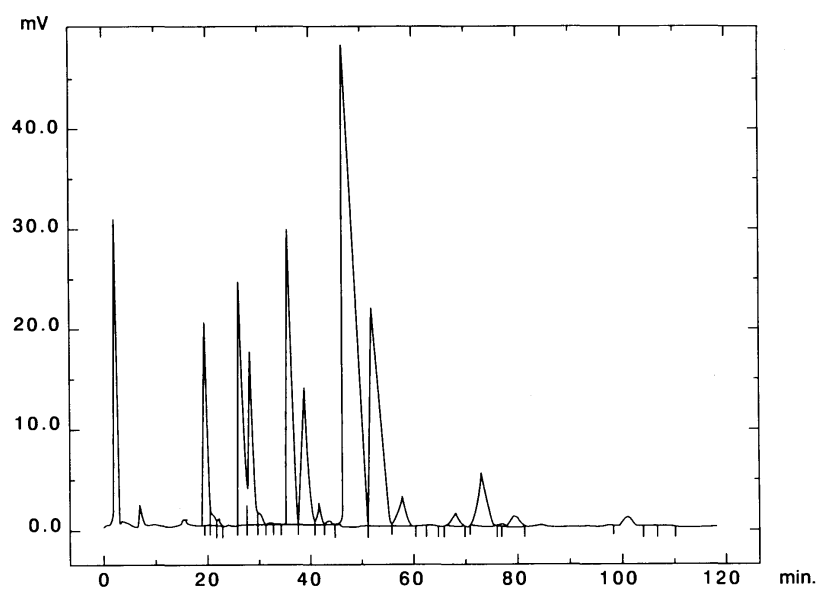
0,00762 mol PPoLn

▼ **M13**

$\text{mol \% OLLn} = \frac{68,522 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10000}$	=	0,14577	
$\text{mol \% LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,295 \% * 9,205 \% * 2}{10000}$	=	0,14577	
$\text{mol \% LLnO} = \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 68,522 \% * 2}{10000}$	=	0,14577	
			0,43671 mol OLLn
$\text{mol \% PLLn} = \frac{16,005 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10000}$	=	0,03400	
$\text{mol \% LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,205 \% * 2}{10000}$	=	0,00111	
$\text{mol \% LLnP} = \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10000}$	=	0,03400	
			0,06911 mol PLLn
$\text{mol \% PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,295 \% * 0,927 \% * 2}{10000}$	=	0,01605	
$\text{mol \% LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,263 \% * 68,522 \% * 2}{10000}$	=	0,01605	
$\text{mol \% OLnPo} = \frac{68,522 \% * 1,154 \% * 1,015 \% * 2}{10000}$	=	0,01605	
			0,04815 mol PoOLn
	ECN42	=	0,69540 mol TAGs

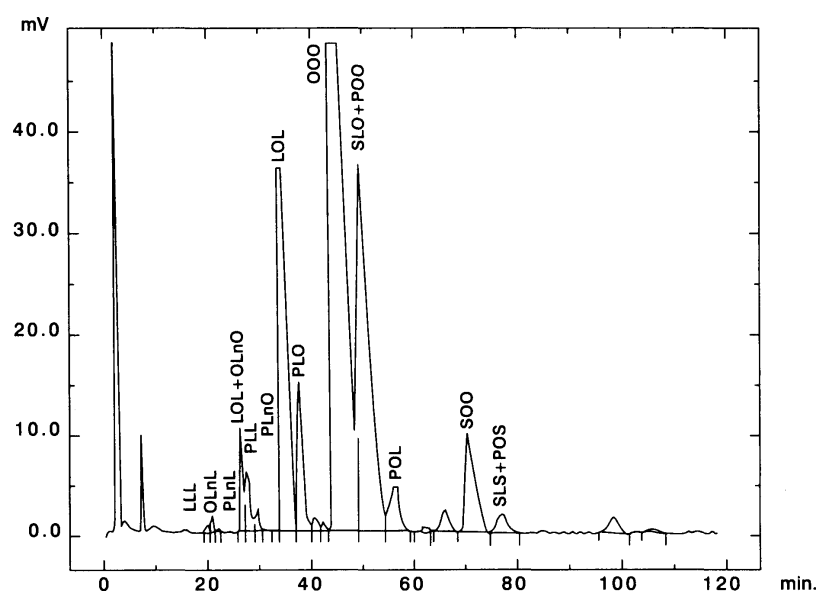
▼ **M14****Фигура 1:** Крива на логаритъм b спрямо f (броят на двойните връзки)

Забележка: La = дафинова киселина, Му = орехова киселина; P = рицинова киселина; St = стеаринова киселина; O = маслинова киселина; L = ленена киселина; Ln = соева киселина.

▼ **M14****Фигура 2:** *Соево масло***Фигура 3:** *Соево масло/Маслиново масло 30/70*

▼ M14

Фигура 4: Маслиново масло



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

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

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

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

3. EQUIPMENT

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

▼ M19**4. REAGENTS**

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

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

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

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

▼ M19

- 5.1.2. Add 50 ml of 2 N potassium hydroxide ethanolic solution, fit the reflux condenser and heat the apparatus to slight boiling on a steam bath, stirring continuously throughout the heating process until saponification has taken place (the solution becomes clear). Continue heating for a further 20 minutes and then add 50 ml of distilled water through the condenser. The condenser is then disconnected and the flask cooled to approximately 30 °C.
- 5.1.3. The contents of the flask are quantitatively transferred to a separating funnel of 500 ml capacity by adding distilled water several times, using a total of around 50 ml distilled water. Add approximately 80 ml of ethyl ether, shake vigorously for approximately 30 seconds and allow to settle (Note 1).

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

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

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

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

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

5.2. Separation of alcoholic fractions

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

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

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

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

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

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

▼ M19

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3. Preparation of the trimethylsilyl ethers

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

▼M19

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

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

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

5.4. **Gas chromatography analysis**

5.4.1. Preliminary operations, column packing

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

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

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

5.4.2. Choice of operating conditions

- 5.4.2.1. The guideline operating conditions are as follows:

— column temperature: the initial isotherm is set at 180 °C for eight minutes and then programmed at 5 °C/minute to 260 °C and a further 15 minutes at 260 °C,

— temperature of evaporator: 280 °C,

— temperature of detector: 290 °C,

— linear velocity of carrier gas: helium 20 to 35 cm/s, hydrogen 30 to 50 cm/s,

— splitting ratio: 1:50 to 1:100,

— sensitivity of instrument: 4 to 16 times the minimum attenuation,

▼M19

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

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

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

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

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

5.4.3. Analytical procedure

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

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

5.4.4. Peak identification

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

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

5.4.5. Quantitative evaluation

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

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

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

where:

A_x = area of the alcohol peak x

A_s = area of 1-eicosanol

m_s = mass of 1-eicosanol in milligrams

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

6. EXPRESSION OF THE RESULTS

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

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

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

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

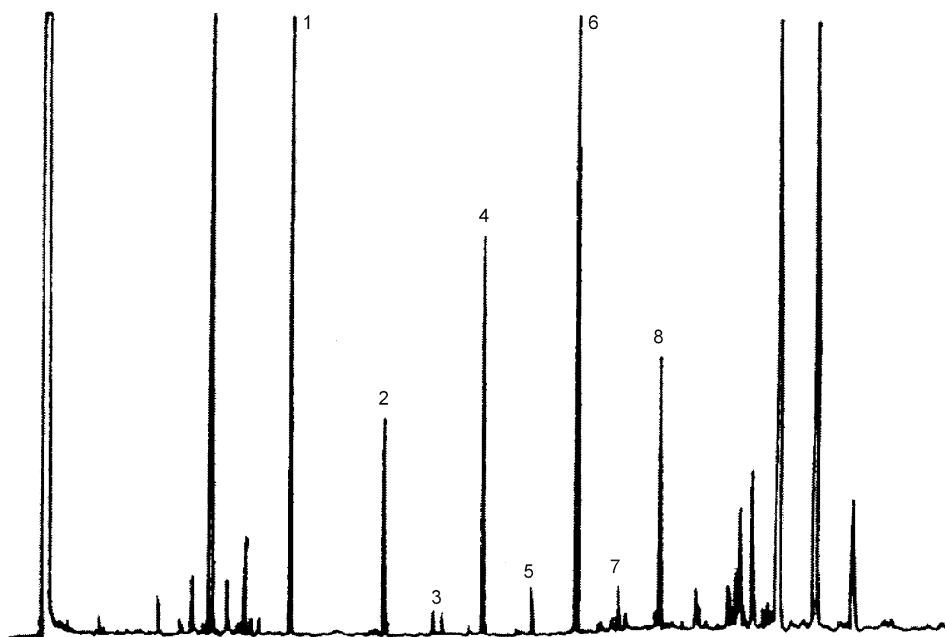


Figure 1 — Chromatogram of the alcoholic fraction of virgin oil

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

▼ **M23***ПРИЛОЖЕНИЕ XX***Метод за определяне на съдържанието на парафини, метилови естери на мастни киселини и етилови естери на мастни киселини чрез капилярна газова хроматография****1. ЦЕЛ**

Този метод се използва за определяне съдържанието на въсьци, метилови и етилови естери на мастни киселини в маслиновите масла. Отделните въсьци и алкилови естери се разделят според броя на въглеродните атоми. Методът се препоръчва като средство за разграничаване на маслиновото масло от маслиновото масло от кюспе и като качествен параметър за необработените маслинови масла с екстра качество, правещ възможно откриването на фалшифицирани смеси на необработени маслинови масла с екстра качество с по-нискокачествени, независимо дали са необработени масла, масла за осветление или обезмирисени масла.

2. ПРИНЦИП

Добавяне на подходящи вътрешни стандарти към маслото и разделяне чрез хроматография върху колонка от хидратиран силикагел. Добиване на елюираната при опитните условия фракция (при полярност, по-ниска от тази за триацилглицерините) и директен анализ чрез капилярна газова хроматография.

3. АПАРАТУРА**3.1. Ерленмайерова колба, 25 ml.****3.2. Стъклена колона** за течна хроматография, с вътрешен диаметър 15 mm, дължина 30—40 cm, оборудвана с кранче.**3.3. Газов хроматограф**, подходящ за използване с капилярна колона, снабдена със система за директно подаване в колоната, състоящ се от:**3.3.1. Термостатирана пещ с програмиране на температурата.****3.3.2. Инжектор за студено пускане** за директно подаване в колоната.**3.3.3. Пламъчно-йонизационен детектор и усилвателен преобразувател.****3.3.4. Записващ интегратор** (забележка 1) за използване с усилвателния преобразувател (точка 3.3.3), с инертност не по-голяма от 1 s и с променлива скорост на подаване на хартията.

Забележка 1: Когато данните от газовата хроматография се въвеждат с персонален компютър може да се използват компютъризирани системи.

3.3.5. Капилярна колона, аморфен кварц (за анализиране на въсьците и метиловите и етиловите естери), дължина от 8—15 m, вътрешен диаметър 0,25—0,32 mm, с вътрешно покритие в течна фаза (забележка 2) до равномерна дебелина на слоя 0,10—0,30 µm.

Забележка 2: За целта се продават подходящи готови течни фази като SE52, SE54 и др.

3.4. Микроспринцовка, 10 µl, със закалена игла, за директно подаване в колоната.**3.5. Електрически уред за разклащане.****3.6. Ротационен изпарител.****3.7. Муфелна пещ.****3.8. Аналитична везна за претегляне с точност до 0,1 mg.**

▼ **M23**

3.9. Стандартно лабораторно оборудване.

4. РЕАГЕНТИ

4.1. **Силикагел**, размер на частиците — mesh 60—200 µm. Силикагелът се поставя в муфелната пещ при 500 °C в продължение на най-малко 4 часа. Остава се да се охлади и след това се добавя 2 % вода, отнесено към използваното количество силикагел. Разклаща се добре, за да се хомогенизира суспензията и се държи в сушилната поне 12 часа преди да се използва.

4.2. **n-хексан** с хроматографска чистота или чистота за остатък (чистотата трябва да бъде проверена).

ВНИМАНИЕ — парите за запалими. Да се държи настрана от източници на топлина, искри или открит пламък. Да се гарантира, че бутилките са винаги добре затворени. При употреба да се осигури подходяща вентилация. Да се избягва натрупването на пари и да се отстранят всички възможни причинители на пожар, като нагреватели или електрически уреди, които не са произведени от незапалим материал. Опасен е при вдишване, тъй като може да причини увреждане на нервните клетки. Да се избягва вдишването им. Ако е необходимо да се използва подходящ апарат за дишане. Да се избягва контакт с очите и кожата.

4.3. **Етилов етер, хроматографска чистота.**

ВНИМАНИЕ — силно запалим и леко токсичен. Предизвиква дразнене на кожата. Вреден при вдишване. Може да причини увреждане на очите. Ефектите може да се проявят със закъснение. Може да образува взривоопасни прекиси. Парите за запалими. Да се държи настрана от източници на топлина, искри или открит пламък. Да се гарантира, че шишетата са винаги добре затворени. При употреба да се осигурява подходяща вентилация. Да се избягва натрупването на пари и да се отстранят всички възможни причинители на пожар, като нагреватели или електрически уреди, които не са произведени от незапалим материал. Да не се изпарява до сухо или почти сухо. Добавянето на вода или друг подходящ редуктор може да намали образуването на перексид. Да не се пие. Да се избягва вдишване на парите. Да се избягва продължителен или многократен контакт с кожата.

4.4. **n-хептан, хроматографска чистота, или изооктан.**

ВНИМАНИЕ — лесно запалим. Вреден при вдишване. Да се държи настрана от източници на топлина, искри или открит пламък. Да се гарантира, че бутилките са винаги добре затворени. При употреба да се осигурява подходяща вентилация. Да се избягва вдишване на парите. Да се избягва продължителен или многократен контакт с кожата.

4.5. **Стандартен разтвор на лаурилов арахидат (забележка 3)** — 0,05 % (m/V) в хептан (вътрешен стандарт за восъци).

Забележка 3: Може да се използват и палмитилов палмитат, миристилов стеарат или арахидилов лауреат.

4.6. **Стандартен разтвор на метилов хептадеканоат — 0,02 % (m/V) в хептан (вътрешен стандарт за метилови и етилови естери).**

4.7. **Судан 1 (1-фенилазо-2-нафтол).**

▼ M23

4.8. Газ носител: водород или хелий, пречистен, чистота за газова хроматография.

ВНИМАНИЕ

Водород. Леснозапалим, намира се под налягане. Да се държи настрана от източници на топлина, искри, открит пламък или електрически уреди, които не са произведени от незапалим материал. Да се гарантира, че клапата на бутилката е затворена, когато тя не се използва. Да се използва винаги с редуцирвентил. Да се освободи пружината на редуцирвентила преди отваряне на клапата на бутилката. Да не се застава пред изходния отвор на бутилката при отваряне на клапата. При употребата да се осигурява подходяща вентилация. Да не се прехвърля водород от една бутилка в друга. Да не се смесват газове в бутилката. Да се гарантира, че бутилките не могат да бъдат преобърнати. Да се пазят от слънчева светлина и настрана от източници на топлина. Да се съхраняват в корозионноустойчива среда. Да не се използват повредени или неетикетирани бутилки.

Хелий. Газ, съгъстен под високо налягане. Намалява количеството на кислорода за дишане. Бутилката да се съхранява затворена. При употреба да се осигурява подходяща вентилация. Да не се влиза в складови площи, освен ако не са с подходяща вентилация. Да се използва винаги с редуцирвентил. Да се освободи пружината на редуцирвентила преди отваряне на клапата на бутилката. Да не се прехвърля газ от една бутилка в друга. Да се гарантира, че бутилките не могат да бъдат преобърнати. Да не се застава пред изходния отвор на бутилката при отваряне на клапата. Да се пазят от слънчева светлина и настрана от източници на топлина. Да се съхраняват в корозионноустойчива среда. Да не се използват повредени или неетикетирани бутилки. Да не се вдишва. Да се използва само за технически цели.

4.9. Спомагателни газове:

— водород, пречистен, с чистота за газова хроматография.

— въздух, пречистен, с чистота за газова хроматография.

ВНИМАНИЕ

Въздух. Газ, съгъстен под високо налягане. Да се използва с повишено внимание при наличие на горими вещества, тъй като температурата на самозапалване на повечето органични съединения във въздуха е значително по-ниска при високо налягане. Да се гарантира, че клапата на шишето е затворена, когато то не се използва. Да се използва винаги редуцирвентил. Да се освободи пружината на редуцирвентила преди отваряне на клапата на бутилката. Да не се застава пред изходния отвор на бутилката при отваряне на клапата. Да не се прехвърля газ от една бутилка в друга. Да не се смесват газове в бутилката. Да се гарантира, че бутилките не могат да бъдат преобърнати. Да се пазят от слънчева светлина и настрана от източници на топлина. Да се съхраняват в корозионноустойчива среда. Да не се използват повредени или неетикетирани бутилки. Въздухът, предназначен за технически цели, не трябва да се вдишва или да се използва за уреди за дишане.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Подготовка на хроматографската колона

Суспендират се 15 g силикагел (точка 4.1) в n-хексан (точка 4.2) и се подават в колоната (точка 3.2). Остава се да се утаи самостоятелно. Утаяването се завършва с помощта на електрически уред за разклащане, за да се осигури по-голяма еднородност на хроматографския слой. Перколират се 30 ml n-хексан, за да бъдат отстранени евентуални онечиствания. С помощта на аналитична везна (точка 3.8) се претеглят точно 500 mg от пробата в 25-милилитрова колба (точка 3.1) и се добавя подходящо количество вътрешен стандарт (точка 4.5) в зависимост от предполагаемото съдържание на въсьци, например се добавя 0,1 mg лаурилов арахидат в случай на маслиново масло, 0,25 - 0,50 mg в случай на масло от маслиново кюспе и 0,05 mg метилов хептадеканоат за маслинови масла (точка 4.6).

▼ **M23**

Подготвената проба се прехвърля в хроматографската колона с помощта на две части от по 2 ml n-хексан (точка 4.2).

Оставя се разтворителят да стигне до 1 mm над горното ниво на абсорбента. Перколят се допълнително n-хексан/етилов етер (99:1) и се събира 220 ml при дебит от около 15 капки на всеки 10 секунди. **(Тази фракция съдържа метиловите и етиловите естери и вощите).** (Забележка 4) (Забележка 5).

Забележка 4: Сместа от n-хексан/етилов етер (99:1) трябва да е прясно приготвена за деня.

Забележка 5: За да се контролира визуално правилното елюиране на вощите, към разтвора на пробата може да бъдат добавени 100 µl оцветител судан I (1 %).

Времето на задържане на оцветителя е между това на вощите и триацилглицерините. Следователно, когато оцветителят достигне дъното на хроматографската колона, отмиването трябва да бъде прекратено, тъй като всички вощи са били елюирани.

Получените фракции се изпаряват в ротационен изпарител до почти пълно отстраняване на разтворителя. Последните 2 ml се отстраняват при слаба струя азот. Събира се фракцията, съдържаща метиловите и етиловите естери, като се разрежда с 2-4 ml n-хептан или изооктан.

5.2. Анализ чрез газова хроматография

5.2.1. Предварителна процедура

Поставя се колоната в газовия хроматограф (точка 3.3), свързвайки входния отвор към системата на колоната, а изходния отвор към детектора. Проверява се апаратът за газова хроматография (работа на газовите контури, ефективност на детектора и записващата система и т.н.).

Ако колоната се използва за първи път, препоръчително е да бъде приведена към желаните условия. Подава се слаб поток от газ през колоната, след което се включва апаратът за газова хроматография. Нагрива се постепенно до достигане след около 4 часа на температура 350 °C.

Тази температура се поддържа в продължение на поне два часа, след което апаратът се регулира за работни условия (регулира се притокът на газ, запалва се пламъкът, свързва се към електронното записващо устройство (точка 3.3.4), регулира се температурата на пещта за колоната, регулира се детекторът и др.). Записва се сигналът при чувствителност поне два пъти по-висока от изискваната за анализа. Основната графика трябва да бъде линейна, без каквито и да било пикове, и да не бъде изместена.

Отрицателно линейно изместване показва, че свързките на колоната не са правилни, а положително изместване показва, че колоната не е приведена правилно към работни условия.

5.2.2. Избор на работните условия за вощи и метилови и етилови естери (забележка 6).

В общия случай работните условия са следните:

— Температура на колоната:

20 °C/min 5 °C/min

първо 80 °C (1') ————— 140 °C ————— 335 °C (20)

— Температура на детектора: 350 °C.

— Инжектирано количество: 1 µl от разтвора в n-хептан (2-4 ml).

▼ **M23**

- Газ носител: хелий или водород с оптимална линейна скорост за съответния газ (виж допълнение А).
- Чувствителност на измервателния уред: подходяща, за да бъдат изпълнени горните условия.

Забележка 6: Поради високата крайна температура се допуска положително изместване, но то не трябва да надвишава 10 % от обхвата на скалата.

Тези условия могат да бъдат променяни според характеристиките на колоната и на газовия хроматограф, за да се отделят всички въсьци и метилови и етилови естери на мастни киселини и да бъде постигнато задоволително максимално разделяне (виж фигури 2, 3 и 4) и време на задържане от 18 ± 3 минути за вътрешния стандарт от лаурилов арахидат. Най-представителният пик за въсьците трябва да бъде над 60 % от обхвата на скалата, а вътрешният стандарт от метил хептадеканоат за метилови и етилови естери трябва да достига обхвата на скалата.

Параметрите за интегриране на пиковите се определят по такъв начин, че да се извърши правилна оценка на съответните площи на пиковите.

5.3. Извършване на анализа

Вземат се 10 µl от разтвора с помощта на микроспринцовка от 10 µl като буталото се изтегля докато иглата се изпразни. Иглата се вкарва в системата за инжектиране и се извършва инжектиране бързо след 1-2 секунди. След около 5 секунди иглата внимателно се изтегля.

Записването продължава до пълното елюиране на въсьците или стигмастидиените, в зависимост от анализираната фракция.

Основната крива следва винаги да отговаря на поставените условия.

5.4. Определяне на пиковите

Пиковите се определят по времената на задържане, като се сравняват с тези на смеси на въсьци, чиито времена на задържане са известни и са анализирани при същите условия. Алкиловите естери се разпознават в смеси на метилови и етилови естери по главните мастни киселини в маслиновите масла (палмитинова и олеинова).

На фигура 1 е представена хроматограма на въсьците в необработено маслиново масло. На фигури 2 и 3 са показани хроматограмите на две продавани на дребно необработени маслинови масла с екстра качество, едното с метилови и етилови естери, а другото без. На фигура 4 са показани хроматограмите за най-висококачествено необработено маслиново масло с екстра качество и същото масло с пикове, дължащи се на 20 % обезмирисено масло

5.5. Количествен анализ на въсьците

С помощта на интегратора се определят площите на пиковите, съответстващи на вътрешния стандарт от лаурилов арахидат и алифатните естери от C₄₀ до C₄₆.

Определя се общото съдържание на въсьци, като се добавя всеки отделен въськ в mg/kg масно вещество както следва:

$$\text{Восьци, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ **M23**

където:

A_x = е площта, съответстваща на пика за отделния естер, в отброяванията на компютъра.

A_s = е площта, съответстваща на пика за вътрешния стандарт от лаурилов арахидат, в отброяванията на компютъра

m_s = е масата на вътрешния стандарт от лаурилов арахидат, в милиграми;

m = е масата на взетата за определяне проба, в грамове.

5.5.1. Количествен анализ на метиловите и етиловите естери

С помощта на интегратора се определят площите на пиковите, съответстващи на вътрешния стандарт от метил хептадеканоат, на метиловите естери на масните киселини C_{16} и C_{18} и на етиловите естери на масните киселини C_{16} и C_{18} .

Определя се общото съдържание на всеки алкилов естер в mg/kg масно вещество, както следва:

$$\text{Естер, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

където:

A_x = е площта, съответстваща на пика за отделния естер C_{16} и C_{18} , в отброяванията на компютъра

A_s = е площта, съответстваща на пика за вътрешния стандарт от метилов хептадеканоат, в отброяванията на компютъра

m_s = е масата на добавения вътрешен стандарт от метилов хептадеканоат, в милиграми;

m = е масата на взетата за определяне проба, в грамове.

6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Записва се сумата от съдържанията на отделните въсьци от C_{40} до C_{46} (*забележка 7*) в милиграми на килограм масно вещество.

Записват се сумите от съдържанията на метиловите и етиловите естери от C_{16} до C_{18} и сумарната стойност от двете суми.

Резултатите следва да бъдат изразени чрез закръгляне до най-близкия mg/kg.

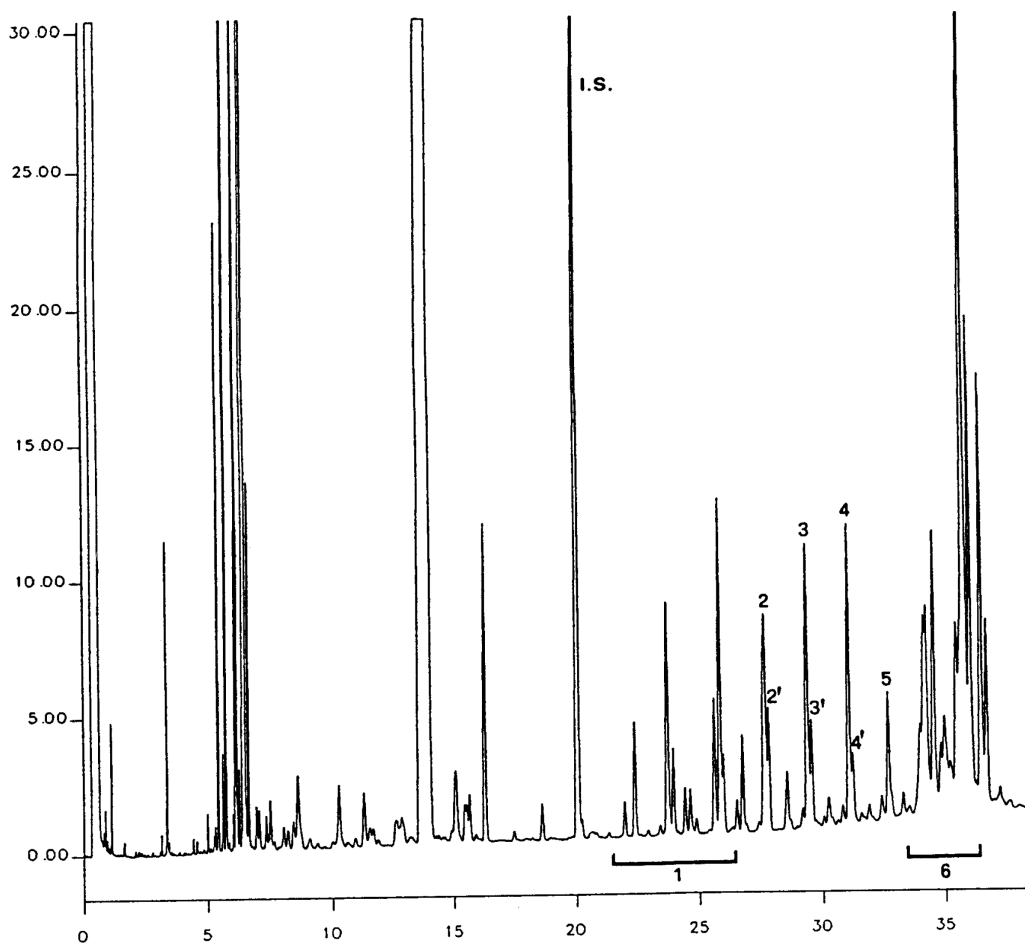
Забележка 7: Съставките, които трябва да бъдат определени количествено, съответстват на пиковите с четен брой въглеродни атоми сред естерите C_{40} до C_{46} , в съответствие с примерната хроматограма на въсьците в маслиновото масло, показана на приложената фигура. За целите на разпознаването, ако естерът C_{46} е разделен, се препоръчва да се анализира фракцията на въсьците на масло от маслиново кюспе, при което пикът C_{46} е различим, защото е явно преобладаващ.

Записва се съотношението на етиловите естери към метиловите естери

▼ M23

Фигура 1

Примерна газова хроматограма на фракцията на восъците в маслиново масло ⁽¹⁾



Пикове с време на задържане на метиловите и етиловите естери на мастни киселини от 5 до 8 минути

Условни знаци:

I.S. — Лаурилов арахидат

1 — дитерпенови естери

2+2' — естери C₄₀

3+3' — естери C₄₂

4+4' — естери C₄₄

5 — естери C₄₆

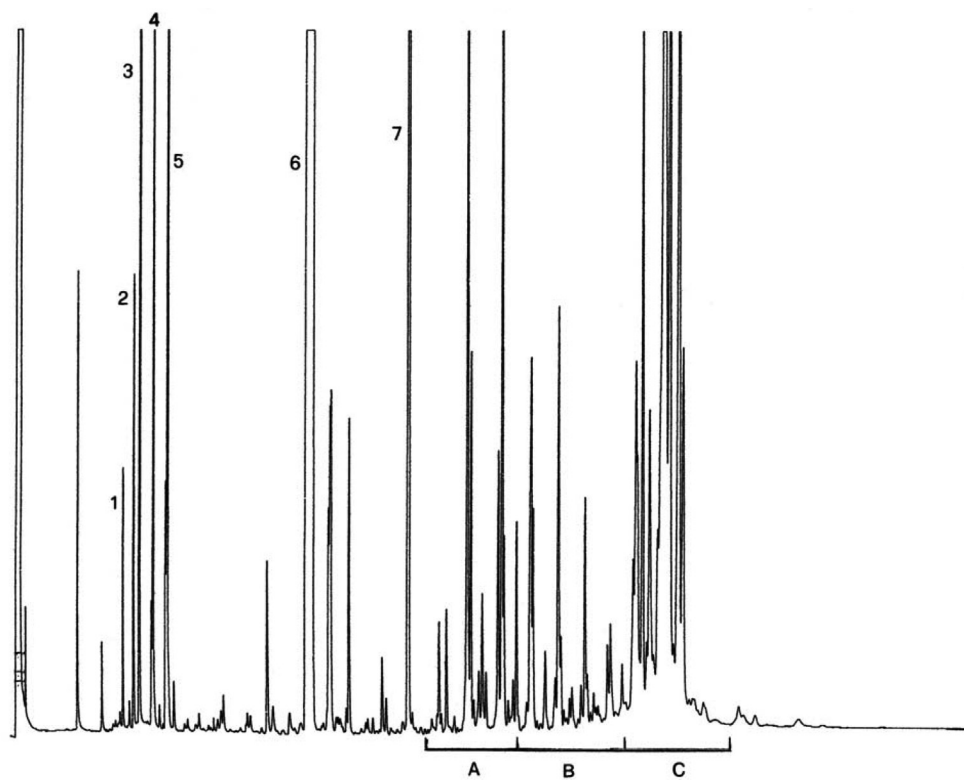
6 = стеролови естери и тритерпенови алкохоли

⁽¹⁾ След елюирането на стероловите естери, хроматограмата не трябва да съдържа изразени пикове (триацилглицерини).

▼ M23

Фигура 2

Метилони естери, етилови естери и вощи в необработено маслиново масло



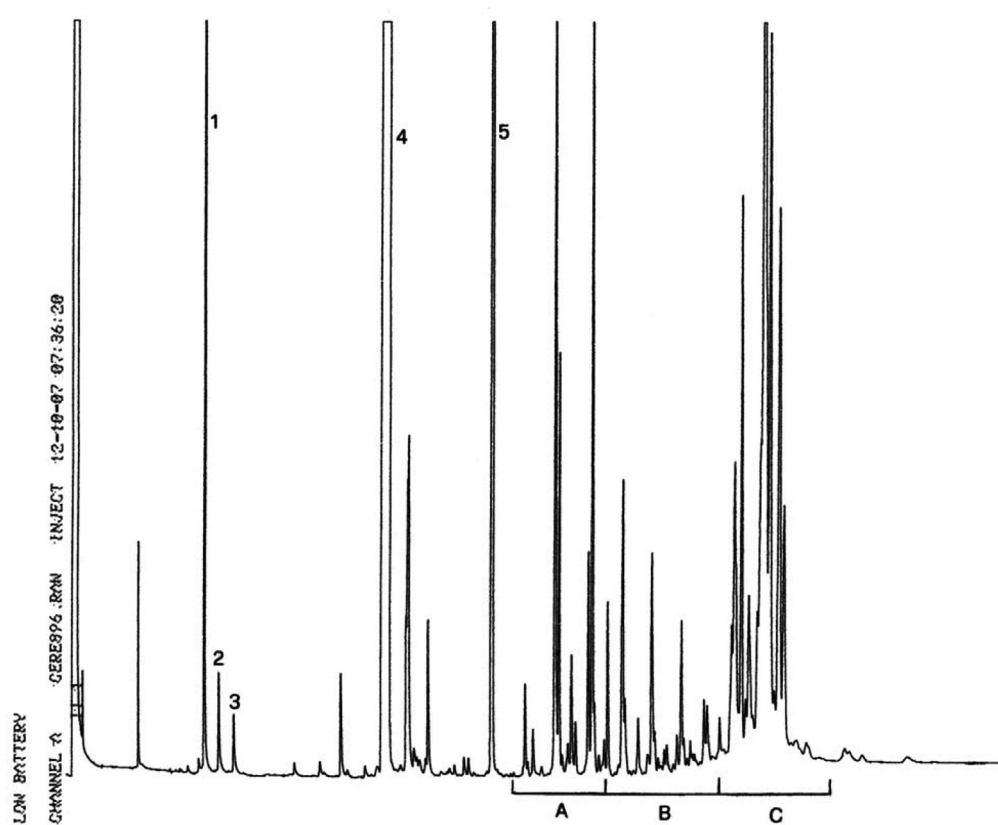
Условни знаци:

- 1 – метил C_{16}
- 2 – етил C_{16}
- 3 – метилов хептадеканоат I.S.
- 4 – метил C_{18}
- 5 – етил C_{18}
- 6 – сквален
- 7 – лаурилов арахидат I.S.
- A – дитерпенови естери
- B – вощи
- C – стеролови естери и тритерпенови естери

▼ M23

Фигура 3

Метилони естери, етилови естери и вощи в необработено маслиново масло с екстра качество



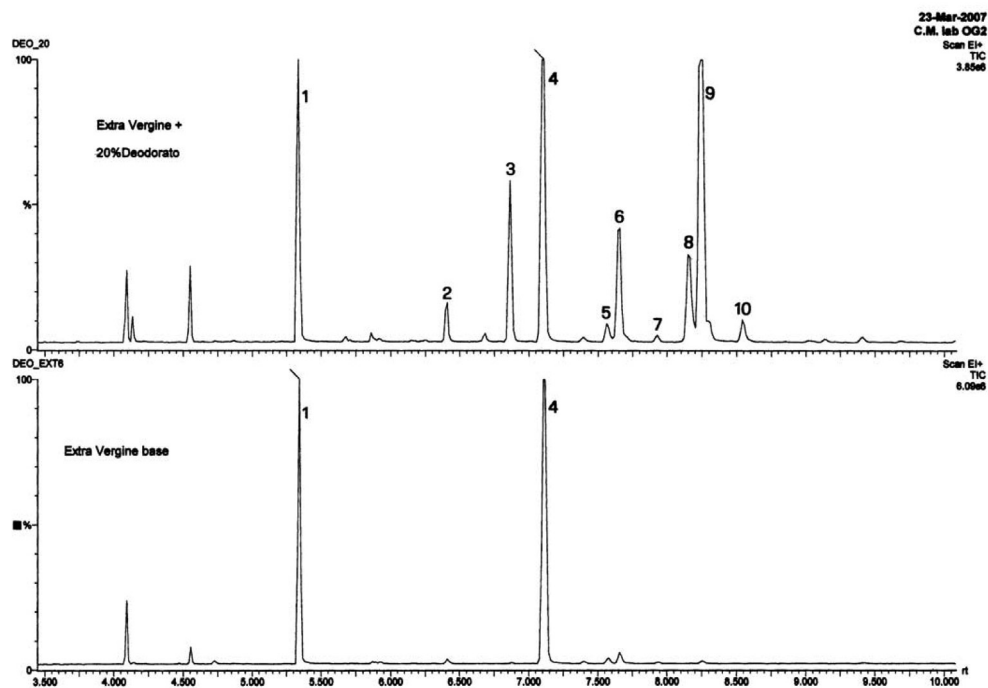
Условни знаци:

- 1 – метилов хептадеканоат I.S.
- 2 – метил C₁₈
- 3 – етил C₁₈
- 4 – сквален
- 5 – лаурилов арахидат I.S.
- A – дитерпенови естери
- B – вощи
- C – стеролови естери и тритерпенови естери

▼ M23

Фигура 4

Част от хроматограма за необработено маслиново масло с екстра качество и
същото масло с пикове от обезмирисено масло



Условни знаци:

- 1 – метилов миристит I.S.
- 2 – метилов палмитат
- 3 – етилов палмитат
- 4 – метилов хептадеканоат I.S.
- 5 – метилов линолеат
- 6 – метилов олеат
- 7 – метилов стеарат
- 8 – етилов линолеат
- 9 – етилов олеат
- 10 – етилов стеарат

▼ M23*Приложение А***Определяне на линейната скорост на газа**

Инжектират се от 1 до 3 μl метан (или пропан) в газовия хроматограф след настройването му към нормалните работни условия. Измерва се времето, за което газът преминава през колоната от момента на инжектирането му до появяването на пика (t_M).

Линейната скорост в cm/s се пресмята по формулата L/t_M , където L е дължината на колоната в сантиметри, а t_M е измереното време в секунди.