

Този текст служи само за информационни цели и няма правно действие. Институциите на Съюза не носят отговорност за неговото съдържание. Автентичните версии на съответните актове, включително техните преамбюли, са версиите, публикувани в Официален вестник на Европейския съюз и налични в EUR-Lex. Тези официални текстове са пряко достъпни чрез връзките, публикувани в настоящия документ

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

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

---

► <b><u>M25</u></b>	Регламент за изпълнение (ЕС) № 299/2013 на Комисията от 26 март 2013 година	L 90	52	28.3.2013 г.
► <b><u>M26</u></b>	Регламент за изпълнение (ЕС) № 1348/2013 на Комисията от 16 декември 2013 година	L 338	31	17.12.2013 г.
► <b><u>M27</u></b>	Делегиран регламент (ЕС) 2015/1830 на Комисията от 8 юли 2015 година	L 266	9	13.10.2015 г.
► <b><u>M28</u></b>	Регламент за изпълнение (ЕС) 2015/1833 на Комисията от 12 октомври 2015 година	L 266	29	13.10.2015 г.
► <b><u>M29</u></b>	Регламент за изпълнение (ЕС) 2016/1227 на Комисията от 27 юли 2016 година	L 202	7	28.7.2016 г.

Поправен със:

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

**▼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**

**▼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.

**▼ M26***Член 2*

1. Характеристиките на маслата, установени в приложение I, се определят в съответствие със следните методи за анализ:

- а) за определяне на свободните мастни киселини, изразени като процент олеинова киселина, се използва методът, описан в приложение II;
- б) за определяне на пероксидното число се използва методът, описан в приложение III;
- в) за определяне на съдържанието на восъци се използва методът, описан в приложение IV;
- г) за определяне на компонентния състав и съдържанието на стероли и тритерпенови диалкохоли чрез капилярна газова хроматография се използва методът, описан в приложение V;
- д) за определяне на процентното съдържание на 2-глицерилмоноопалмитат се използва методът, описан в приложение VII;
- е) за извършване на спектрофотометричен анализ се използва методът, описан в приложение IX;

**▼ M28**

- ж) за определяне състава на мастните киселини се използва методът, описан в приложение X;

**▼ M26**

- з) за определяне на съдържанието на летливи халогенирани разтворители се използва методът, описан в приложение XI;
- и) за оценка на органолептичните характеристики на необработеното маслиново масло се използва методът, описан в приложение XII;
- й) за определяне на съдържанието на стигмастидени се използва методът, описан в приложение XVII;
- к) за определяне на съдържанието на триглицериди с ECN42 се използва методът, описан в приложение XVIII;

**▼ M28**

- л) за определяне на съдържанието на алифатни и тритерпенови алкохоли се използва методът, описан в приложение XIX;

**▼ M26**

- м) за определяне на съдържанието на восъци, метилови естери на мастни киселини и етилови естери на мастни киселини се използва методът, описан в приложение XX.

**▼ M28****▼ M26**

2. Проверката на органолептичните характеристики на необработените масла от страна на националните органи или техни представители се извършва посредством групи от дегустатори, одобрени от държавите членки.

**▼ M26**

Ако такава група потвърди класифицирането на дадено масло, органолептичните характеристики на маслото, посочени в първа алинея, се приемат за отговарящи на категорията.

Ако групата не потвърди декларираната категория по отношение на органолептичните характеристики, при поискване от заинтересованата страна националните органи или техни представители съевременно организират две насрещни оценки, които се извършват от други одобрени групи дегустатори, като поне една от тези оценки се извършва от одобрена от засегнатата държава членка производител група дегустатори. Ако декларираната категория бъде потвърдена при най-малко две от насрещните оценки, съответните характеристики се приемат за отговарящи на декларираните. При липса на такова потвърждение разходите за насрещните оценки се поемат от заинтересованата страна.

3. Когато националните органи или техни представители извършват проверка на характеристиките на маслото съгласно посоченото в параграф 1, вземането на проби се извършва в съответствие с международните стандарти EN ISO 661 относно подготовката на пробата за изпитване и EN ISO 5555 относно вземането на проби. Независимо от разпоредбите на точка 6.8 от стандарт EN ISO 5555 обаче в случай на партиди от такива масла в директни опаковки пробите се вземат съгласно приложение Ia към настоящия регламент. При наличието на наливни масла, при които вземането на проби не може да се извърши в съответствие със стандарт EN ISO 5555, пробите се вземат в съответствие с инструкциите, предоставени от компетентния орган на държавата членка.

Без да се засягат разпоредбите на стандарт EN ISO 5555 и глава 6 от стандарт EN ISO 661, взетите проби се пренасят възможно най-бързо на тъмно и хладно място и се изпращат за лабораторен анализ не по-късно от петия работен ден след вземането им; в противен случай пробите се съхраняват така, че да се избегне тяхното повреждане или влошаването на състоянието им по време на транспортирането или съхранението, преди да бъдат изпратени в лабораторията.

4. За целите на предвидената в параграф 3 проверка анализите, посочени в приложения II, III, IX, XII и XX, и — когато е приложимо — всички необходими насрещни анализи, изисквани съгласно националното законодателство, се провеждат преди изтичането на срока на минималната трайност, ако тази проверка засяга пакетирани продукти. При вземане на проби от наливни масла анализите се извършват не по-късно от шестия месец след месеца, през който са били взети пробите.

По отношение на другите анализи, предвидени в настоящия регламент, срок не е предвиден.

Освен в случаите, когато пробата е била взета по-малко от два месеца преди изтичането на срока на минималната трайност, ако резултатите от анализите не отговарят на характеристиките на декларираната категория маслиново масло или маслиново масло от остатъчен материал, засегнатата страна бива уведомена не по-късно от един месец преди изтичането на срока, посочен в първа алинея.

**▼ M26**

5. С оглед определянето на характеристиките на маслиновото масло по методите, предвидени в параграф 1, първа алинея, резултатите от анализа се подлагат на пряко сравнение с пределните стойности, посочени в настоящия регламент.

**▼ M25***Член 2а*

1. За целите на настоящия член „търгувано маслиново масло“ означава общото количество маслиново масло и масло от маслиново кюспе на дадена държава членка, което се консумира в тази държава членка или се изнася от същата държава членка.

2. Държавите членки гарантират, че проверките за съответствие се извършват селективно, въз основа на анализ на риска и с подходяща честота, така че да се гарантира, че търгуваното маслиново масло съответства на декларираната категория.

3. Критериите за оценка на риска могат да включват:

- а) категорията на маслото, периода на производство, цената на маслата в сравнение с други растителни масла, операциите по смесване и опаковане, съоръженията и условията за съхранение, държавата на произход, държавата на местоназначение, начина на транспорт или обема на партидата;
- б) положението на операторите в търговската верига, търгуваните от тях обеми и/или стойности, асортимента на търгуваните от тях категории масла, вида на извършваната стопанска дейност, като пресоване, складиране, рафиниране, смесване, опаковане или продажба на дребно;
- в) констатациите, направени по време на предишни проверки, включително броя и вида на констатираните недостатъци, обичайното качество на търгуваните масла, работните характеристики на използваните технически съоръжения;
- г) надеждността на използваните от операторите системи за гарантиране на качеството или за самоконтрол във връзка със спазването на пазарните стандарти;
- д) мястото на извършване на проверката, особено ако това е първият входен пункт на Съюза, последният изходен пункт на Съюза или мястото, където маслата се произвеждат, опаковат, товарят или продават на крайния потребител;
- е) всяка друга информация, която би могла да покаже, че съществува риск от несъответствие.

4. Държавите членки определят предварително:

- а) критериите за оценка на риска от несъответствие на партидите;
- б) въз основа на анализ на риска за всяка категория риск — минималния брой на операторите или партидите и/или количества, които ще бъдат подложени на проверка за съответствие.

**▼ M25**

Годишно се провежда най-малко една проверка за съответствие на всеки хиляда тона маслиново масло, търгувано в държавата членка.

5. Държавите членки проверят съответствието като:
- a) провеждат, независимо в каква последователност, посочените в приложение I анализи; или
  - б) следват реда, посочен в приложение Ib относно схемата за вземане на решения, докато бъде достигнато едно от решенията, съдържащо се в схемата за вземане на решения.

**▼ M19****▼ M25***Член 3*

Когато се установи, че дадено масло не отговаря на описанието за категорията си, съответната държава членка налага, без да се засягат другите санкции, ефективни, пропорционални и възпиращи санкции, които се определят в зависимост от сериозността на установената нередност.

Когато при проверките се откриват значителни нередности, държавите членки увеличават честотата на проверките по отношение на етапа на предлагане на пазара, категорията на маслата, произхода или други критерии.

**▼ M5***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,
- 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.

**▼ B**

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.

**▼ M25***Член 7a*

Физическите или юридическите лица и групите от такива лица, които държат маслиново масло и масло от маслиново кюспе за каквито и да било професионални или търговски цели, от етапа на екстракция във фабриката за производство на маслиново масло до етапа на бутилиране включително, са длъжни да водят входящи и изходящи регистри за всяка категория от тези масла.

Държавата членка гарантира, че задължението, установено в първа алинея, надлежно се изпълнява.

*Член 8*

1. Държавите членки уведомяват Комисията за мерките за прилагане на настоящия регламент. Те уведомяват Комисията за всички последващи изменения.

2. Най-късно до 31 май всяка година държавите членки предават на Комисията доклад относно прилагането на настоящия регламент през предходната календарна година. Докладът съдържа най-малко резултатите от проверките за съответствие, извършени по отношение на маслиновите масла съгласно образците, съдържащи се в приложение XXI.

3. Уведомленията, посочени в настоящия регламент, се извършват в съответствие с Регламент (ЕО) № 792/2009 на Комисията <sup>(1)</sup>.

**▼ B***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.

<sup>(1)</sup> ОВ L 228, 1.9.2009 г., стр. 3.



▼ 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 категориите маслиново масло
Приложение Ia:	Вземане на проби от маслиново масло или маслиново масло от остатъчен материал, доставяни в директни опаковки
Приложение Ib:	Схема на решенията за проверка на съвместимостта на пробата от маслиново масло с декларираната категория
Приложение II:	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 на компонентния състав и съдържанието на стероли и на тритерпенови диалкохоли чрез капилярна газова хроматография
Приложение VII:	► <b>M21</b> Определяне на процентното съдържание на 2-глицерил монопалмитат ◀

**▼ M20**

\_\_\_\_\_

**▼ B**

Приложение IX:	Спектрофотометрично изследване в ултравиолетовия спектър
----------------	--

**▼ M28**

Приложение X:	Определяне на метилови естери на мастни киселини чрез газова хроматография
---------------	--

**▼ B**

Приложение XI:	Определяне на халоген-съдържащите разтворители на маслиновото масло
Приложение XII:	Метод за органолептична оценка на необработено маслиново масло на международния съвет за маслиновите продукти (iocs)

**▼ M20**

\_\_\_\_\_

**▼ M19**

\_\_\_\_\_

**▼ B**

Приложение XV:	Маслено съдържание на остатъчния материал
Приложение XVI:	Определяне стойността на йодното число
Приложение XVII:	Метод за определяне на стигмастидени в растителни масла
Приложение XVIII:	Определяне на разликата между действителното и теоретичното съдържание на триацилглицерини с esp 42
Annex XIX:	► <b>M28</b> Определяне на съдържанието на алифатни и тритерпенови алкохоли чрез капилярна газова хроматография ◀

**▼ M23**

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

**▼ M28**

\_\_\_\_\_

**▼ M25**

Приложение XXI:	Резултати от проверките за съответствие, извършени по отношение на маслиновите масла, посочени в член 8, параграф 2
-----------------	---

## ПРИЛОЖЕНИЕ I

## ХАРАКТЕРИСТИКИ НА КАТЕГОРИИТЕ МАСЛИНОВО МАСЛО

Категория	Етилови естери на мастни киселини (FAEEs) (*)	Киселинност (%) (*)	Пероксидно число mEq O <sub>2</sub> /kg (*)	Восъци mg/kg (**)	2-глицерилмонопалмитат (%)	Стигма-стадиени mg/kg (1)	Разлика: ESN42 (BETX) и ESN42 (теоретично изчисление)	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>268</sub> или K <sub>270</sub> (*)	Делта-K (*)	Органолептична оценка Медианен дефект (Md) (*)	Органолептична оценка Медиана на признака „плодов аромат“ (Mf) (*)
1. Необработено маслиново масло „Extra virgin“	FAEEs ≤ 40 mg/kg (2013-2014 стопанска година) (2)	≤ 0,8	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9, ако сумарният процент палмитинова киселина ≤ 14 %	≤ 0,05	≤  0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
	FAEEs ≤ 35 mg/kg (2014-2016 стопанска година)				≤ 1,0, ако сумарният процент палмитинова киселина > 14 %							
2. Необработено маслиново масло „Virgin“	FAEEs ≤ 30 mg/kg (след 2016 стопанска година)	≤ 2,0	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9, ако сумарният процент палмитинова киселина ≤ 14 %	≤ 0,05	≤  0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
	—				≤ 1,0, ако сумарният процент палмитинова киселина > 14 %							

▼ M27

Категория	Етилови естери на мастни киселини (FAEEs) (*)	Киселинност (%) (*)	Пероксидно число mEq O <sub>2</sub> /kg (*)	Восьци mg/kg (**)	2-глицерилмонопалмитат (%)	Стигма-стадиени mg/kg (1)	Разлика: ESN42 (BETX) и ESN42 (теоретично изчисление)	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>268</sub> или K <sub>270</sub> (*)	Делта-K (*)	Органолептична оценка Медианен дефект (Md) (*)	Органолептична оценка Медиана на признака „плодов аромат“ (Mf) (*)
3. Маслиново масло за осветление	—	> 2,0	—	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 300 (3)	≤ 0,9, ако сумарният процент палмитинова киселина ≤ 14 %	≤ 0,50	≤  0,3	—	—	—	Md > 3,5 (4)	—
					≤ 1,1, ако сумарният процент палмитинова киселина > 14 %							
4. Рафинирано маслиново масло	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9, ако сумарният процент палмитинова киселина ≤ 14 %	—	≤  0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1, ако сумарният процент палмитинова киселина > 14 %							
5. Необработено маслиново масло, съставено от рафинирано маслиново масло и маслиново масло „Virgin“	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9, ако сумарният процент палмитинова киселина ≤ 14 %	—	≤  0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0, ако сумарният процент палмитинова киселина > 14 %							

▼ M27

Категория	Етилови естери на мастни киселини (FAEEs) (*)	Киселинност (%) (*)	Пероксидно число mEq O <sub>2</sub> /kg (*)	Восьци mg/kg (**)	2-глицерилмонопалмитат (%)	Стигма-стадиени mg/kg (1)	Разлика: ESN42 (BETX) и ESN42 (теоретично изчисление)	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>268</sub> или K <sub>270</sub> (*)	Делта-K (*)	Органолептична оценка Медианен дефект (Md) (*)	Органолептична оценка Медиана на признака „плодов аромат“ (Mf) (*)
6. Нерафинирано масло от остатъчен материал	—	—	—	C40 + C42 + C44 + C46 > 350 (5)	≤ 1,4	—	≤  0,6	—	—	—	—	—
7. Рафинирано масло от остатъчен материал	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,4	—	≤  0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Маслиново масло от остатъчен материал	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 > 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) Граничната стойност се отнася за маслиновите масла, произведени от 1 март 2014 г. нататък

(3) Маслата със съдържание на восьци между 300 mg/kg и 350 mg/kg се считат за маслиново масло за осветление, ако общото съдържание на алифатни алкохоли е ≤ 350 mg/kg или ако процентното съдържание на еритродиол и уваол е ≤ 3,5 %.

(4) Медианният дефект е по-малък или равен на 3,5, а медианата на признака „плодов аромат“ е равна на 0.

(5) Маслата със съдържание на восьци между 300 mg/kg и 350 mg/kg се считат за нерафинирано 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 %.

▼ M27

Категория	Съдържание на мастни киселини (1)						Общо количество транс-олеинови изомери (%)	Общо количество транс-линолови + транс-линоленови изомери (%)	Компонентен състав на стероли						Общо стероли (mg/kg)	Еритродиол и уваол (%) (**)
	Миристинова (%)	Линоленова (%)	Арахиднова (%)	Ейкозенова (%)	Бехенова (%)	Лигноцеринова (%)			Холестерол (%)	Брасикастерол (%)	Кампестерол (2) (%)	Стигмастерол (%)	Привиденβситостерол (3) (%) (**)	Делта-7-стигмастенол (2) (%)		
1. Необработено маслиново масло „Extra virgin“	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Необработено маслиново масло „Virgin“	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Маслиново масло за осветление	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (4)
4. Рафинирано маслиново масло	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Маслиново масло, съставено от рафинирано маслиново масло и необработено маслиново масло „Virgin“	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Нерафинирано масло от остатъчен материал	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (5)
7. Рафинирано масло от остатъчен материал	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5

## ▼ M27

Категория	Съдържание на мастни киселини (1)						Общо количество транс-олеинови изомери (%)	Общо количество транс-линолови + транс-линоленови изомери (%)	Компонентен състав на стероли						Общо стероли (mg/kg)	Еритродиол и уваол (%) (**)
	Миристинова (%)	Линоленова (%)	Арахинова (%)	Ейкозенова (%)	Бехенова (%)	Лигноцеринова (%)			Холестерол (%)	Брасикастерол (%)	Кампестерол (2) (%)	Стигмастерол (%)	Привиден βситостерол (3) (%) (**)	Делта-7-стигмастенол (2) (%)		
8. Маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 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: 7,50-20,00; палмитоолеинова: 0,30-3,50; хептадеканова: ≤ 0,30; хептадеценива: ≤ 0,30; стеаринова: 0,50-5,00; олеинова: 55,00-83,00; линолова: 2,50-21,00.

(2) Вж. допълнението към настоящото приложение.

(3) Привиден β-ситостерол: Делта-5,23-стигмастидиенол + клеростерол + бета-ситостерол + ситостанол + делта-5-авенастерол + делта-5,24-стигмастидиенол.

(4) Маслата със съдържание на восъци между 300 mg/kg и 350 mg/kg се считат за маслиново масло за осветление, ако общото съдържание на алифатни алкохоли е ≤ 350 mg/kg или ако процентното съдържание на еритродиол и уваол е ≤ 3,5 %.

(5) Маслата със съдържание на восъци между 300 mg/kg и 350 mg/kg се считат за нерафинирано маслиново масло от остатъчен материал, ако общото съдържание на алифатни алкохоли е над 350 mg/kg или ако процентното съдържание на еритродиол и уваол е над 3,5 %.

## Забележки:

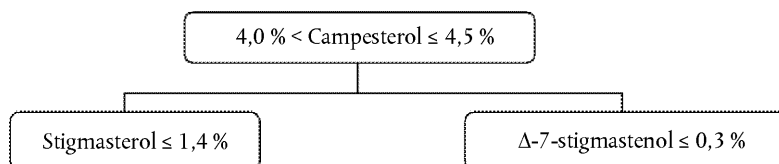
- Резултатите от анализите трябва да бъдат изразени с толкова знака след десетичната запетая, с колкото се дава всяка една характеристика. Последната цифра трябва да бъде увеличена с една единица, ако следващата цифра е по-голяма от 4.
- Ако дори само една характеристика не отговаря на посочените стойности, категорията на маслото може да бъде променена или то да бъде обявено за нечисто за целите на настоящия регламент.
- Ако дадена характеристика, която се отнася за качеството на маслото, е обозначена със звездичка (\*), това означава, че: — за маслиновото масло за осветление — може и двете относими граници да бъдат едновременно различни от посочените стойности; за необработените маслинови масла „Virgin“ — 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 необработени маслинови масла „Virgin“.
- Ако дадена характеристика е обозначена с две звездички (\*\*), това означава, че може двете съответни граници за всички видове маслиново масло от остатъчен материал да бъдат едновременно различни от посочените стойности.

▼ **M27**

## Допълнение

**СХЕМА НА РЕШЕНИЯТА**

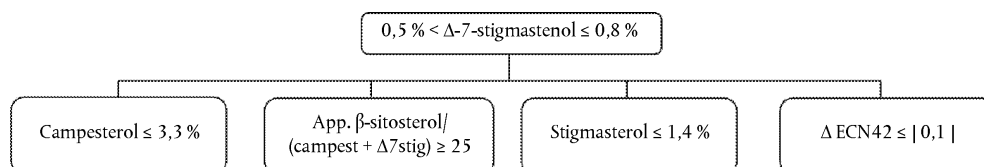
Схема на решенията по отношение на **кампестерола** за необработено маслиново масло „Virgin“ и необработено маслиново масло „Extra virgin“:



Другите параметри трябва да са в границите, определени в настоящия регламент.

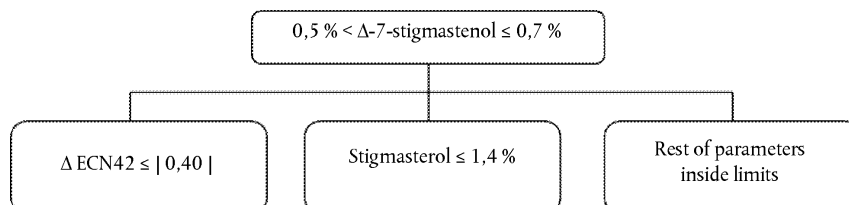
Схема на решенията по отношение на **делта-7-стигмастенола** за:

— необработено маслиново масло „Extra virgin“ и необработено маслиново масло „Virgin“



Другите параметри трябва да са в границите, определени в настоящия регламент.

— маслинови масла от остатъчен материал (нерафинирани и рафинирани)





▼ **M26***ПРИЛОЖЕНИЕ Ia***ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ ОТ МАСЛИНОВО МАСЛО ИЛИ МАСЛИНОВО МАСЛО ОТ ОСТАТЪЧЕН МАТЕРИАЛ, ДОСТАВЯНИ В ДИРЕКТНИ ОПАКОВКИ**

Методът за вземане на проби се прилага за партии маслиново масло или маслиново масло от остатъчен материал в директни опаковки. В зависимост от това, дали директната опаковка надвишава 5 литра или не, се прилагат различни методи за вземане на проби.

„Партида“ означава набор продажни единици, които са произведени, изработени и опаковани в условия, позволяващи маслото, съдържащо се във всяка продажна единица, да бъде считано за хомогенно по отношение на всички аналитични характеристики. Идентифицирането на дадена партида трябва да се извършва в съответствие с Директива 2011/91/ЕС на Европейския парламент и на Съвета <sup>(1)</sup>.

„Единична проба“ означава количеството масло, съдържащо се в директна опаковка и взето произволно от партидата.

**1. СЪДЪРЖАНИЕ НА ПЪРВИЧНАТА ПРОБА****1.1. Директна опаковка, която не надвишава 5 литра**

„Първична проба“ за директна опаковка, която не надвишава 5 литра, означава броят на единичните проби, взети от дадена партида и отговарящи на изискванията по таблица 1.

*Таблица 1***Изисквания относно максималния размер на първичните проби**

Когато директната опаковка е с капацитет от	Първичната проба трябва да съдържа масло от
а) 1 литър или повече	а) 1 директна опаковка
б) по-малко от 1 литър	б) минималния брой опаковки с общ капацитет най-малко 1,0 литър

В зависимост от потребностите си (например органолептична оценка, извършена от лаборатория, различна от тази, която е провела химичните анализи, насрещен анализ и др.) всяка държава членка може да увеличи посочения в таблица 1 брой опаковки, който представлява първична проба.

**1.2. Директна опаковка, която надвишава 5 литра**

„Първична проба“ за директна опаковка, която надвишава 5 литра, означава представителна част от общия брой единични проби, взети от дадена партида и отговарящи на изискванията по таблица 2. Първичната проба трябва да се състои от различни извадки.

„Извадка“ от първична проба означава всяка една от опаковките, съставляващи първичната проба.

*Таблица 2***Минимален брой единични проби, които подлежат на подбор**

Брой опаковки в партидата	Минимален брой единични проби, които подлежат на подбор
До 10	1
От ... 11 до 150	2

<sup>(1)</sup> Директива 2011/91/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 13 декември 2011 г. относно означенията или маркировките, идентифициращи партидата, към която принадлежи дадена храна (ОВ L 334, 16.12.2011 г., стр. 1).

▼ **M26**

Брой опаковки в партидата	Минимален брой единични проби, които подлежат на подбор
От ... 151 до 500	3
От ... 501 до 1 500	4
От ... 1 501 до 2 500	5
> 2 500 на 1 000 опаковки	1 допълнителна единична проба

С цел да се намали обемът на директните опаковки, използвани при пробите, съдържанието на единичните проби се хомогенизира за приготвяне на първичната проба. Различните единични проби се изсипват в общ контейнер за хомогенизиране чрез разбъркване, така че да се осигури възможно най-добра защита от въздуха.

Съдържанието на първичната проба трябва да се излее в поредица от опаковки с минимален капацитет 1,0 литър, всяка от които представя извадка от първичната проба.

В зависимост от потребностите си (например органолептична оценка, извършена от лаборатория, различна от тази, която е провела химичните анализи, насрещен анализ и др.) всяка държава членка може да увеличи броя първични проби.

Всяка опаковка трябва да се напълни така, че горният въздушен слой да бъде ограничен до минимум, след което да се затвори и запечата по подходящ начин, гарантиращ, че продуктът е защитен от външна намеса.

Извадките трябва да бъдат етикетирани, за да се гарантира правилното им идентифициране.

## 2. АНАЛИЗИ И РЕЗУЛТАТИ

- 2.1. Всяка първична проба трябва да се раздели на лабораторни проби в съответствие с точка 2.5 от стандарт EN ISO 5555 и да се анализира съобразно реда, показан в съдържащата се в приложение 1б схема на решенията, или по всеки друг начин на случаен принцип.
- 2.2. В случаите, когато всички резултати от анализите отговарят на характеристиките на обявената категория масло, цялата партида се обявява за отговаряща на изискванията.

Ако дори един резултат от анализите не отговаря на характеристиките на обявената категория масло, цялата партида се обявява за неотговаряща на изискванията.

## 3. ПРОВЕРКА НА КАТЕГОРИЯТА НА ПАРТИДАТА

- 3.1. С цел да се провери категорията на дадена партида, компетентният орган може да увеличи броя на първичните проби, взети от различни точки на партидата, в съответствие със следната таблица:

Таблица 3

### Брой първични проби съгласно размера на партидата

Размер на партидата (в литри)	Брой първични проби
По-малко от 7 500	2
От 7 500 до по-малко от 25 000	3
От 25 000 до по-малко от 75 000	4
От 75 000 до по-малко от 125 000	5
125 000 и повече	6 + 1 за всеки допълнителни 50 000 литра

**▼ M26**

Всяка единична проба, съставляваща първична проба, трябва да се взема от точно определено място в партидата, без да се прави прекъсване; необходимо е местоположението на всяка първична проба да се записва и да може да се идентифицира безпогрешно.

Съставянето на всяка първична проба трябва да се извършва в съответствие с процедурите, посочени в точки 1.1 и 1.2.

След това всяка първична проба се подлага на анализите, посочени в член 2, параграф 1.

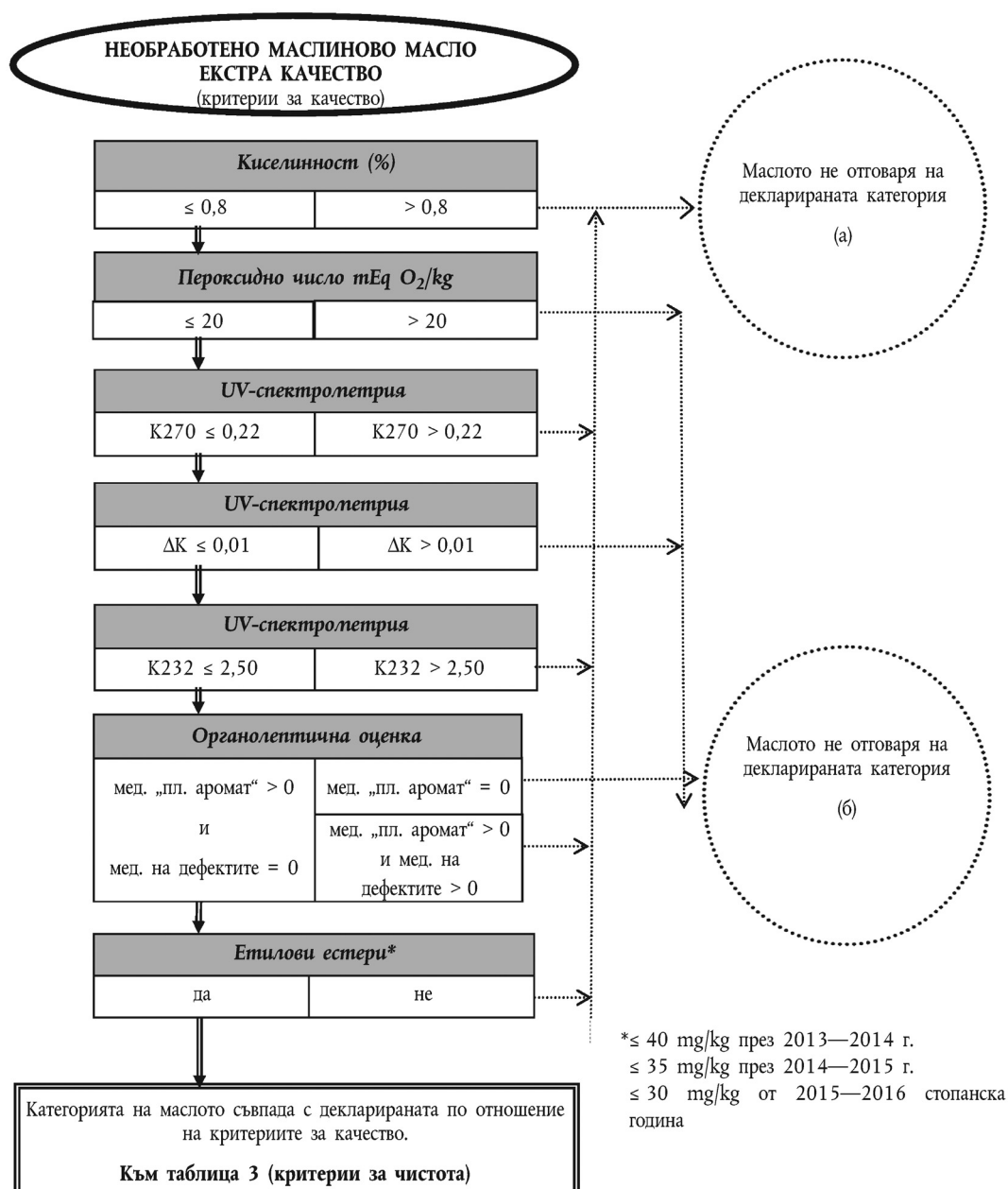
- 3.2. Когато един от резултатите от посочените в член 2, параграф 1 анализи на поне една първична проба не отговаря на характеристиките на декларираната категория масло, цялата партида, от която е била взета пробата, се обявява за неотговаряща на изискванията.

▼ M26

## ПРИЛОЖЕНИЕ 16

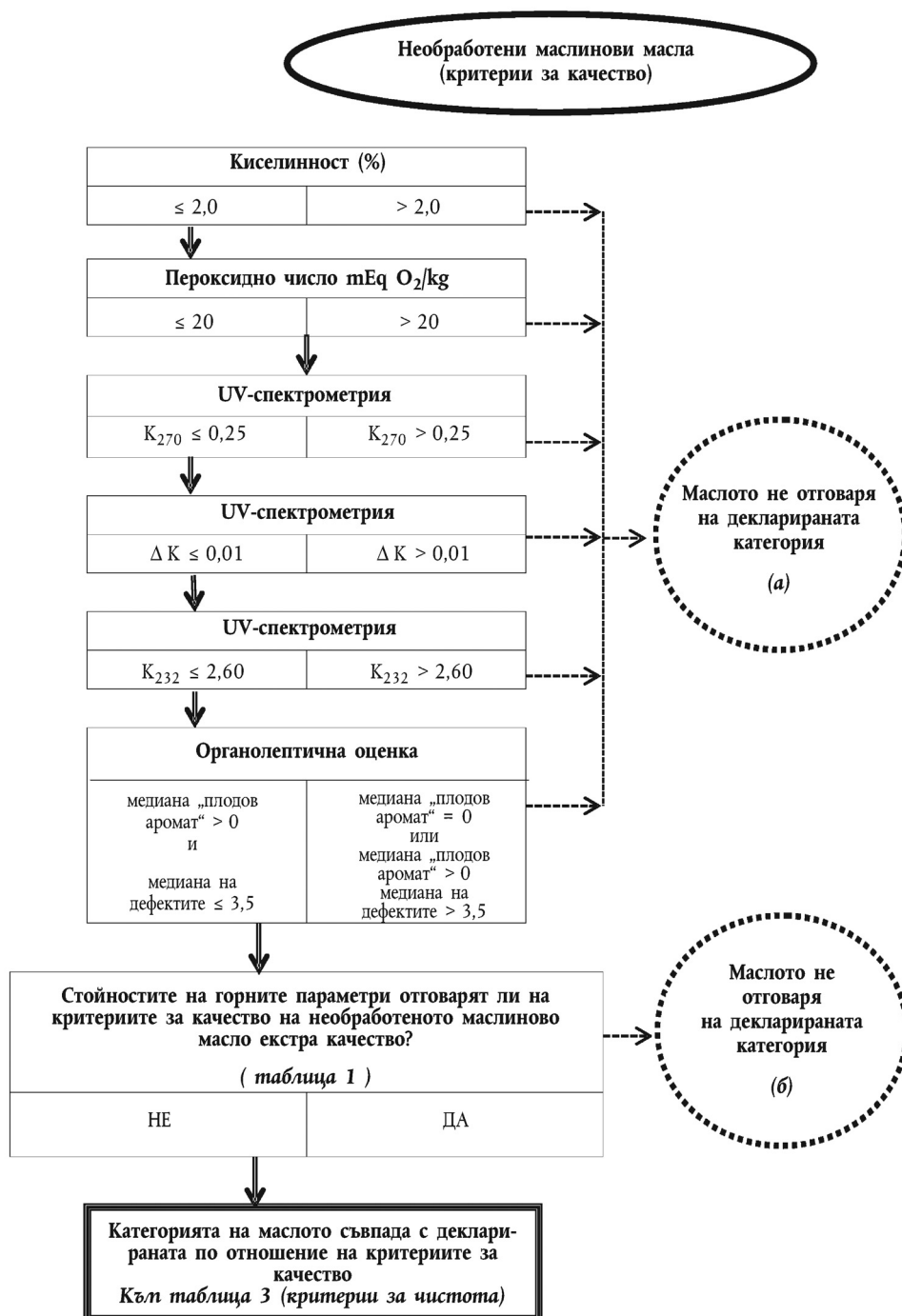
СХЕМА НА РЕШЕНИЯТА ЗА ПРОВЕРКА НА СЪВМЕСТИМОСТТА НА ПРОБАТА  
ОТ МАСЛИНОВО МАСЛО С ДЕКЛАРИРАНАТА КАТЕГОРИЯ

Таблица 1



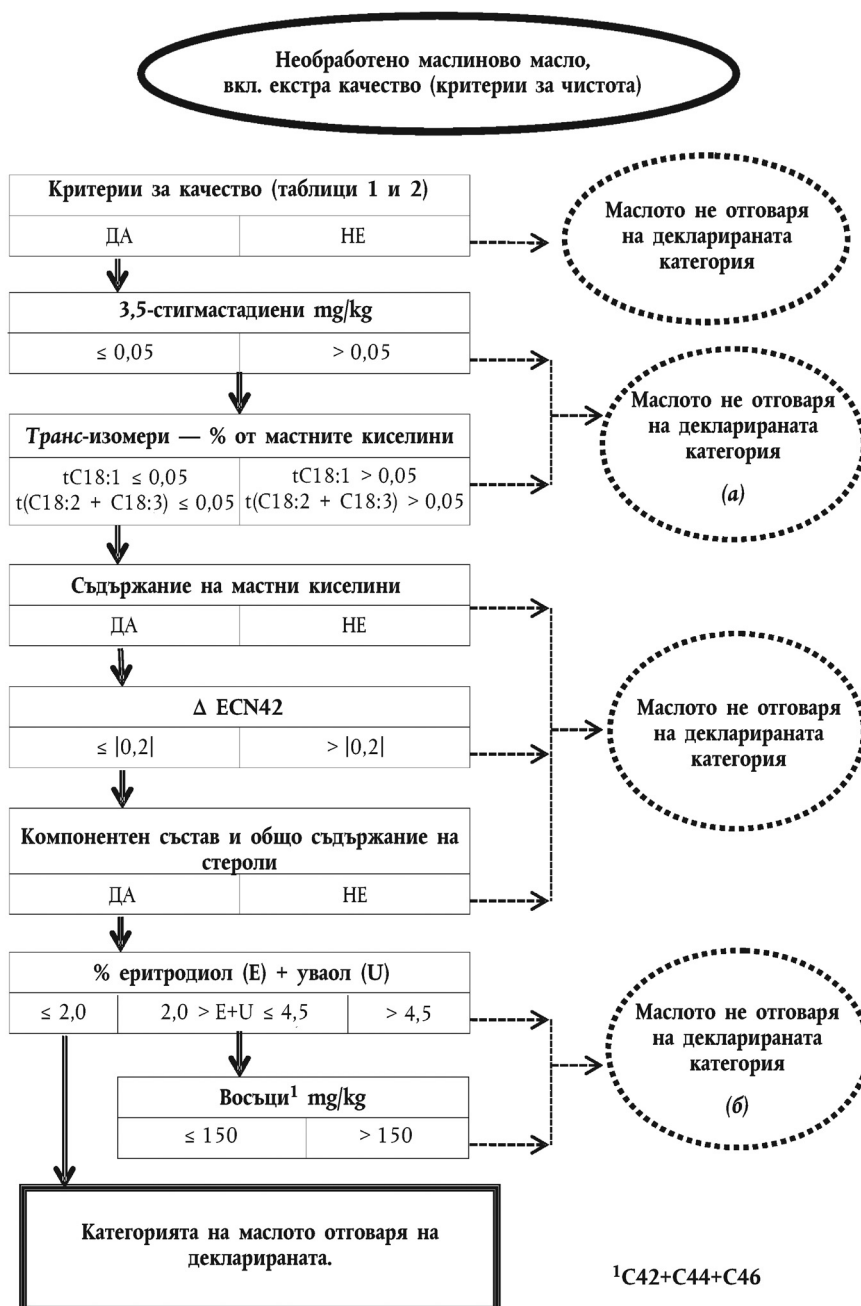
▼ M26

Таблица 2



▼ M26

Таблица 3



▼ M26

## Допълнение 1

Таблица на съответствието между приложенията към настоящия регламент и анализите, определени в схемата на решенията

— Киселинност	Приложение II	Определяне на свободните мастни киселини, студен метод
— Пероксидно число	Приложение III	Определяне на пероксидното число
— UV-спектрометрия	Приложение IX	Спектрофотометричен анализ
— Органолептична оценка	Приложение XII	Органолептична оценка на необработено маслиново масло
— Етилови естери	Приложение XX	Метод за определяне на съдържанието на въсьци, метилови естери на мастни киселини и етилови естери на мастни киселини чрез капилярна газова хроматография
— 3,5-стигмадиени	Приложение XVII	Метод за определяне на стигмадиени в растителни масла
▼ <u>M28</u>		
— <i>Транс</i> -изомери на мастните киселини	Приложение X	Определяне на метилови естери на мастни киселини чрез газова хроматография
— Съдържание на мастни киселини	Приложение X	Определяне на метилови естери на мастни киселини чрез газова хроматография
▼ <u>M26</u>		
— ΔECN42	Приложение XVIII	Определяне на компонентния състав на триглицеридите с ECN42 (разлика между данните от BETX и теоретичното съдържание)
— Компонентен състав и общо съдържание на стероли	Приложение V	Определяне на компонентния състав и съдържанието на стероли и на тритерпенови алкохоли чрез капилярна газова хроматография
— Еритродиол и уваол		
— Въсьци	Приложение IV	Определяне на съдържанието на парафини чрез капилярна газова хроматография
▼ <u>M28</u>		
— Алифатни и тритерпенови алкохоли	Приложение XIX	Определяне на съдържанието на алифатни и тритерпенови алкохоли чрез капилярна газова хроматография
▼ <u>M26</u>		
— Наситени мастни киселини в позиция 2	Приложение VII	Определяне на процентното съдържание на 2-глицерилмонопалмитат

▼ **M29****ПРИЛОЖЕНИЕ II****ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СВОБОДНИТЕ МАСТНИ КИСЕЛИНИ, СТУДЕН МЕТОД****1. ОБХВАТ И ПРИЛОЖНО ПОЛЕ**

Този метод описва определянето на свободните мастни киселини в маслиновите масла и маслиновите масла от остатъчен материал. Съдържанието на свободни мастни киселини се изразява като киселинност, изчислена като процент олеинова киселина.

**2. ПРИНЦИП**

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

**3. РЕАКТИВИ**

Всички реактиви трябва да са с квалификация „чист за анализ“, а водата, която се използва, трябва да е или дестилирана, или с еквивалентна чистота.

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

Неутрализира се точно в момента на употреба с разтвора на калиев хидроксид (3.2), с добавяне на 0,3 ml от разтвора на фенолфталеин (3.3) на 100 ml от сместа.

*Забележка 1:* диетиловият етер е лесно запалим и може да образува експлозивни пероксиди. Трябва да се работи със специално внимание при употребата му.

*Забележка 2:* ако не е възможно да се използва диетилов етер, може да се използва смес от разтворители, съдържаща етанол и толуен. Ако е необходимо, етанолът може да се замести с пропан-2-ол.

**3.2 Калиев хидроксид или натриев хидроксид, титруван етанолов или воден разтвор,  $c(\text{KOH})$  [или  $c(\text{NaOH})$ ] около 0,1 mol/l или, ако е необходимо,  $c(\text{KOH})$  [или  $c(\text{NaOH})$ ] около 0,5 mol/l. Разтвори могат да се доставят от търговската мрежа.**

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

Ако при използването на воден разтвор на калиев хидроксид (или на натриев хидроксид) се наблюдава разделяне на фази, водният разтвор се заменя с етанолов разтвор.

*Забележка 3:* стабилизирани безцветни разтвори на калиев хидроксид (или на натриев хидроксид) може да се приготви по следния начин. Довеждат се до кипене 1 000 ml етанол или вода с 8 g калиев хидроксид (или натриев хидроксид) и 0,5 g алуминиеви стружки и кипенето се поддържа с обратен хладник в продължение на един час. Дестилира се незабавно. Изискваното количество калиев хидроксид (или натриев хидроксид) се разтваря в дестилата. Остава се за няколко дни и бистрата супернатантна течност се декантира от утайката от калиев карбонат (или натриев карбонат).

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



▼ **M29**

3.3 Фенолфталеин, разтвор от 10 g/l в 95 до 96 % етанол (v/v) или алкалиблау 6В, или тимолфталеин, разтвор от 20 g/l в 95 до 96 % етанол (v/v). В случай на силно оцветени масла следва да се използва алкалиблау или тимолфталеин.

## 4. АПАРАТУРА

Обикновено лабораторно оборудване, включващо:

4.1 Аналитична везна;

4.2 250 ml конусовидна колба;

4.3 10 ml бюрета клас А, градуирана през 0,05 ml, или еквивалентна автоматична бюрета.

## 5. ПРОЦЕДУРА

5.1 **Подготовка на пробата за изпитване**

Ако пробата е мътна, тя следва да се филтрува.

5.2 **Маса на пробата**

Пробата се взема в зависимост от очакваната киселинност, в съответствие със следната таблица:

Очаквана киселинност (киселинност, изразена като олеинова киселина g/100 g)	Маса на пробата (g)	Точност на претегляне (g)
от 0 до 2	10	0,02
> 2 до 7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Пробата се претегля в конусовидната колба (4.2).

5.3 **Определяне**

Пробата (5.2) се разтваря в 50 до 100 ml от предварително неутрализираната смес от диетилов етер и етанол (3.1).

Титрува се, като се разклаща, с 0,1 mol/l разтвор на калиев хидроксид (или на натриев хидроксид) (3.2) (вж. забележка 4) до промяна в индикатора (цветът на оцветения индикатор се задържа в продължение на най-малко 10 секунди).

*Забележка 4:* ако изискваното количество от 0,1 mol/l разтвор на калиев хидроксид (или на натриев хидроксид) надвишава 10 ml, се използва 0,5 mol/l разтвор или се променя масата на пробата, в съответствие с очакваното съдържание на свободни киселини и предложената таблица.

*Забележка 5:* ако разтворът помътнее по време на титруването, се добавя достатъчно количество от разтворителите (3.1) до получаването на бистър разтвор.

Второ определяне се извършва само ако първият резултат е по-висок от определената граница за категорията на маслото.

**▼ M29**

## 6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Киселинността в тегловни проценти олеинова киселина е равна на:

$$V \times c \times \frac{M}{1\,000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

където:

V = обемът на използвания титруван разтвор на калиев хидроксид (или на натриев хидроксид), в милилитри;

c = точната концентрация на използвания титруван разтвор на калиев хидроксид (или на натриев хидроксид), в mol/l;

M = 282 g/mol, моларната маса на олеиновата киселина, в g/mol;

m = масата на пробата, в грамове.

Киселинността, изразена като олеинова киселина, се протоколира, както следва:

- а) до втория знак след десетичната запетая за стойности от 0 до 1 включително;
- б) до първия знак след десетичната запетая за стойности над 1 до 100 включително.



## 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 прокарване на поток от чист сух инертен газ през него.
- 6.2. Ледена оцетна киселина, с качество за аналитични цели, освободена от кислород чрез прокарване 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 тиосулфат, 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 тиосулфат (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 тиосулфат (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 тиосулфат (6.4.), използван за опита, коригиран, след като се вземат предвид резултатите от контролния опит;

T = точната молярност на използвания разтвор на натриев тиосулфат (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**

Масното 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 капилярна 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 капилярна 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. (Възможно е да се използват и информативни системи, които позволяват компютризирано събиране на данните от газовата хроматография.)
    - 3.3.5. Капилярна 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  $\mu\text{m}$ . (Стационарни фази от тип SE-52 или SE-54, годни за употреба, се намират в търговската мрежа.)
  - 3.4. Микроспринцовка с вместимост 10  $\mu\text{l}$ , 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  $\mu\text{m}$ .

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  $22 \pm 4$  °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 °С. 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 линейен, 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 °С/ минута		5 °С/ минута		20 °С/ минута	
в началото 80 °С (1')	→	240 °С	→	325 °С (6')	→	340 °С (10'),

— температура на детектора: 350 °С,

— 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 C<sub>32</sub> 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 C<sub>40</sub> до C<sub>46</sub>.

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

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

където:

A<sub>x</sub> = лице на пика на всеки естер, в квадратни милиметри;

A<sub>s</sub> = лице на пика на вътрешния стандарт, в квадратни милиметри;

m<sub>s</sub> = 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 C<sub>40</sub> до C<sub>46</sub>, в mg/kg мастно вещество (ppm).

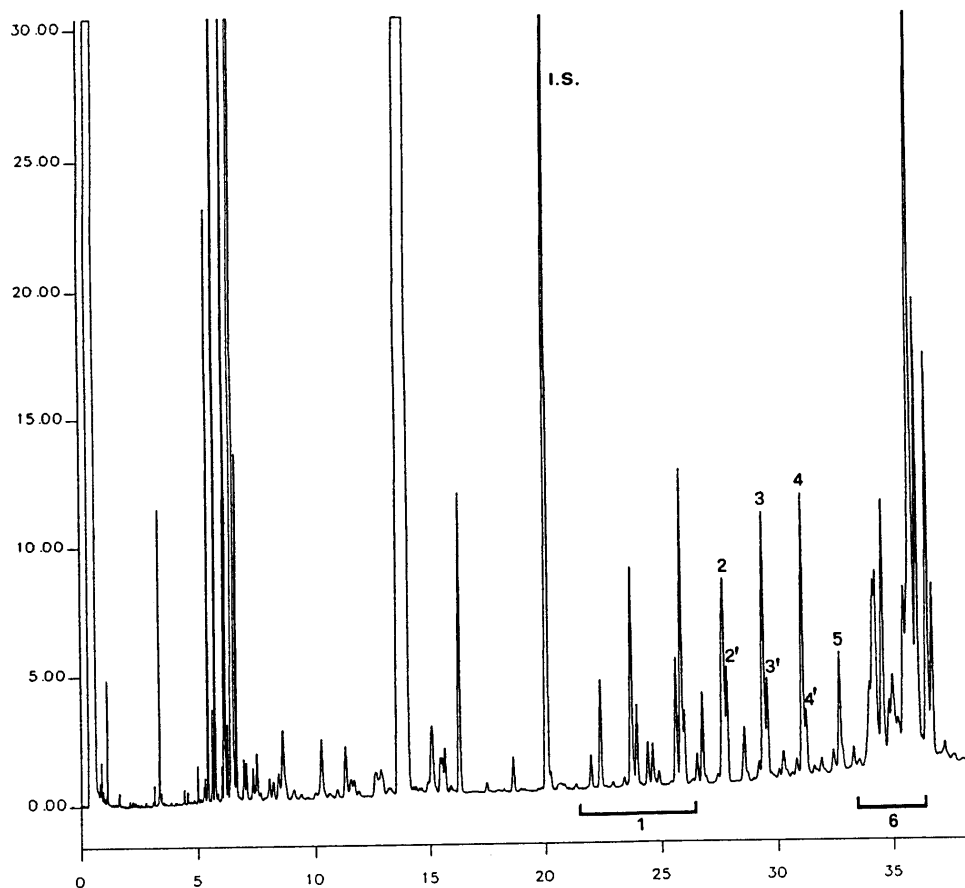
*Забележка.* Компонентите, които трябва да се определят, се отнасят до пиковете с четно въглеродно число между естерите C<sub>40</sub> и C<sub>46</sub>, съгласно примера на хроматограмата на парафините в маслиновото масло, посочена на фигурата по-долу. Ако естерът C<sub>46</sub> се появи двойно, се препоръчва за идентифицирането му да се анализира фракцията на парафините в маслиново масло от остатъчен материал, където пикът C<sub>46</sub> се идентифицира лесно, тъй като е най-изразеният.

Резултатите се дават с точност до една десета.



## ▼ M21

Фигура

Хроматограма на парафините в маслиново масло <sup>(1)</sup>

Легенда:

- I.S. = лауринов арахидат;
- 1 = дитерпенови естери;
- 2 + 2' = естери C<sub>40</sub>;
- 3 + 3' = естери C<sub>42</sub>;
- 4 + 4' = естери C<sub>44</sub>;
- 5 = естери C<sub>46</sub>;
- 6 = стеролови естери и тритерпенови алкохоли.

<sup>(1)</sup> 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  $\mu\text{l}$  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  $\text{cm/s}$ , се изчислява по формулата  $L/t_M$ , където  $L$  е дължината на колонката в сантиметри, а  $t_M$  е засеченото време в секунди.

▼ **M26***ПРИЛОЖЕНИЕ V***ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КОМПОНЕНТНИЯ СЪСТАВ И СЪДЪРЖАНИЕТО НА СТЕРОЛИ И НА ТРИТЕРПЕНОВИ ДИАЛКОХОЛИ ЧРЕЗ КАПИЛЯРНА ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ****1. ОБХВАТ**

Методът описва процедура за определяне на отделното и общото съдържание на стероли и тритерпенови диалкохоли в маслиновите масла и маслиновите масла от остатъчен материал.

**2. ПРИНЦИП**

Маслото, към което е добавен  $\alpha$ -холестанол като вътрешен стандарт, се осапунява с етанолов разтвор на калиев хидроксид, след което неосапуняемите съставки се екстрахират с помощта на етилов етер.

Фракцията на стеролите и на тритерпеновите диалкохоли се отделя от неосапуняемите съставки чрез тънкослойна хроматография на основна плака със силикагел. Фракциите, възстановени от силикагела, се преобразуват в триметилсилилови етери, след което се анализират чрез капилярна газова хроматография.

**3. ОБОРУДВАНЕ**

Стандартно лабораторно оборудване, включващо по-конкретно следното:

- 3.1. Колба с вместимост 250 ml с обратен хладник със стъклен шлиф.
- 3.2. Делителна фуния с вместимост 500 ml.
- 3.3. Колби с вместимост 250 ml.
- 3.4. Пълен набор за анализ чрез тънкослойна хроматография с използване на стъклени плаки с размер 20 × 20 cm.
- 3.5. Ултравioletова лампа с дължина на вълната 254 или 366 nm.
- 3.6. Микроспринцовки с вместимост 100  $\mu$ l и 500  $\mu$ l.
- 3.7. Цилиндрична фуния за филтруване, подходяща за филтруване под вакуум, с порьозна преграда G3 (порьозност 15—40  $\mu$ m), диаметър приблизително 2 cm, височина 5 cm и мъжка муфа с шлиф.
- 3.8. Конусовидна колба с вместимост 50 ml и женска муфа с шлиф, която може да се монтира към фунията за филтруване (точка 3.7).
- 3.9. Епруветка с вместимост 10 ml с конично дъно и стъклена тапа.
- 3.10. Газов хроматограф, подходящ за използване с капилярна колона, снабдена с инжекционна система за разделяне, който се състои от:
  - 3.10.1. Термостатична камера за колони с възможност за поддържане на желаната температура с точност до  $\pm 1$  °C;
  - 3.10.2. Инжектор с възможност за настройка на температурата с изпарителен елемент от персиланизирано стъкло и със система за разделяне.
  - 3.10.3. Пламъчно-йонизационен детектор (ПЙД).
  - 3.10.4. Система за добив на данни, подходяща за употреба с ПЙД (точка 3.10.3.), с възможност за ръчно въвеждане.
- 3.11. Капилярна колона от стопен кварц с дължина 20—30 m и вътрешен диаметър 0,25—0,32 mm, покрита с 5% дифенил — 95% диметилполисилоксан (неподвижна фаза с SE-52 или SE-54 или еквивалентна) до постигането на еднородна дебелина между 0,10 и 0,30  $\mu$ m.

▼ **M26**

- 3.12. Микроспринцовка за газова хроматография с вместимост 10  $\mu$ l и циментирана игла, подходяща за инжектиране с разделяне.
- 3.13. Десикатор за калциев дихлорид.
4. РЕАГЕНТИ
- 4.1. Калиев хидроксид с минимален титър 85%.
- 4.2. Етанолов разтвор на калиев хидроксид — приблизително 2 N.  
130 g калиев хидроксид (точка 4.1) се разтваря с охлаждане в 200 ml дестилирана вода и се долива до един литър с етанол (точка 4.10). Разтворът се съхранява в плътно затворени бутилки от тъмно стъкло за не повече от два дни.
- 4.3. Етилов етер с чистота за анализ.
- 4.4. Етанолов разтвор на калиев хидроксид — приблизително 0,2 N.  
13 g калиев хидроксид (точка 4.1) се разтваря в 20 ml дестилирана вода и се долива до един литър с етанол (точка 4.10).
- 4.5. Безводен натриев сулфат с чистота за анализ.
- 4.6. Стъклени плаки (20 × 20 cm), покрити със силикагел, без флуоресцентен индикатор и с дебелина 0,25 mm (могат да се доставят от търговската мрежа готови за употреба).
- 4.7. Толуен с чистота за хроматографски анализ.
- 4.8. Ацетон с чистота за хроматографски анализ.
- 4.9. n-Хексан с чистота за хроматографски анализ.
- 4.10. Етилов етер с чистота за хроматографски анализ.
- 4.11. Етанол с чистота за анализ.
- 4.12. Етилацетат с чистота за анализ.
- 4.13. Референтен разтвор за тънкослойна хроматография: холестерол или фитостероли плюс 5% разтвор на еритродиол в етилацетат (точка 4.11).
- 4.14. 0,2% разтвор на 2,7-дихлорофлуоресцеин в етанол. Той се подлага на слаба алкализация чрез добавяне на няколко капки 2 N алкохолен разтвор на калиев хидроксид (точка 4.2).
- 4.15. Безводен пиридин с чистота за хроматографски анализ (вж. бележка 5).
- 4.16. Хексаметилдисилазан с чистота за анализ.
- 4.17. Триметилхлоросилан с чистота за анализ.
- 4.18. Разтвори на проби от триметилсилилови етери.  
Те се приготвят в момента на употреба от стероли и еритродиол, получени от масла, в които се съдържат.
- 4.19.  $\alpha$ -Холестанол с чистота над 99% (чистотата трябва да бъде проверена чрез газова хроматография).
- 4.20. Вътрешен стандартен разтвор на  $\alpha$ -холестанол, 0,2% разтвор (m/V) в етилацетат (точка 4.11).
- 4.21. Разтвор на фенолфталеин, 10 g/l в етанол (точка 4.10).
- 4.22. Газ носител: водород или хелий, пречистени за газова хроматография.
- 4.23. Помощни газове: водород, хелий, азот и въздух, пречистени за газова хроматография.

▼ **M26**

- 4.24. Смес от n-хексан (точка 4.9)/етилов етер (точка 4.10) в съотношение 65:35 (V/V).
- 4.25. Реагент за силилиране, състоящ се от смес от пиридин/хексаметилдисилазан/ триметилхлоросилан в съотношение 9:3:1 (V/V/V).

## 5. ПРОЦЕДУРА

- 5.1. Приготвяне на неосапуняемите съставки.
- 5.1.1. С помощта на микроспринцовка с вместимост 500 µl (точка 3.6) в колба с вместимост 250 ml (точка 3.1) се въвежда обем вътрешен стандартен разтвор на α-холестанол (точка 4.20), чието съдържание на холестанол съответства на приблизително 10% от съдържанието на стероли в пробата. Така например за мостра маслиново масло с маса 5 g се прибавят 500 µl разтвор на α-холестанол (точка 4.20) и 1 500 µl, ако маслиновото масло е от остатъчен материал. Мострата се подлага на изпарение до изсъхване на топла водна баня със слаба струя азот; след охлаждане на колбата в нея се претеглят  $5 \pm 0,01$  g от сухата филтрувана проба.

*Бележка 1:* Животинските или растителните масла, съдържащи значителни количества холестерол, могат да отбележат пик с време на задържане, подобно на това при холестанола. В този случай стероловата фракция се подлага на двукратен анализ — с вътрешен стандарт и без него.

- 5.1.2. Добавят се 50 ml 2 N етанолов разтвор на калиев хидроксид (точка 4.2) и малко пемза, поставя се обратният хладник и се нагрива до слабо кипене, докато се извърши осапуняването (разтворът се избистря). Нагриването продължава още 20 минути, след което през върха на хладника се прибавят 50 ml дестилирана вода, хладникът се отделя и колбата се охлажда до приблизително 30 °C.
- 5.1.3. Съдържанието на колбата се прехвърля количествено в делителна фуния с вместимост 500 ml (точка 3.2), като се използват няколко части дестилирана вода (50 ml). Добавят се приблизително 80 ml етилов етер (точка 4.10) и делителната фуния се разклаща енергично в продължение на около 60 секунди, като налягането се освобождава периодично чрез нейното обръщане и отваряне на спирателния кран. Изчаква се до получаването на пълно разделяне на две фази (бележка 2).

След това сапуненият разтвор се отлива възможно най-изчерпателно в отделна делителна фуния. По същия начин се извършват още две екстракции на фазата на водно-алкохолна смес, като всеки път се използват 60 до 70 ml етилов етер (точка 4.10).

*Бележка 2:* Всяка емулсия може да бъде разрушена с прибавяне на малки количества етанол (точка 4.11).

- 5.1.4. Трите етерни екстракта се смесват в делителна фуния, съдържаща 50 ml вода. Промиването с вода (50 ml) продължава, докато промивната вода престане да се оцветява в розово при добавянето на капка разтвор на фенолфталеин (точка 4.21).

След отстраняване на промивната вода се филтрува безводен натриев сулфат (точка 4.5) в предварително претеглена колба с вместимост 250 ml, като фунията и филтърът се промиват с малки количества етилов етер (точка 4.10).

- 5.1.5. Разтворителят се изпарява под вакуум чрез дестилация в ротационен изпарител при температура 30 °C. Добавят се 5 ml ацетон и летливият разтворител се отстранява напълно посредством лека въздушна струя. Остатъкът се изсушава в пещ при температура  $103 \pm 2$  °C в продължение на 15 минути. След това се охлажда в десикатори и се претегля с точност до 0,1 mg.

▼ **M26**

5.2. Отделяне на фракцията на стеролите и тритерпеновите диалкохоли (еритродиол + уваол)

5.2.1. Подготовка на основните плаки за тънкослойна хроматография. Плаките със силикагел (точка 4.6) се потапят на 4 cm в 0,2 N етанолов разтвор на калиев хидроксид (точка 4.5) за 10 секунди, след което се оставят да изсъхнат в лабораторна камина за два часа и накрая се поставят в пещ при 100 °C за един час.

Изваждат се от пещта и се съхраняват в десикатор за калциев хлорид (точка 3.13) до момента на употреба (така обработените плаки трябва да се използват в рамките на 15 дни).

*Бележка 3:* Когато за отделяне на стероловата фракция се използват основни плаки със силикагел, не е необходимо неосапуняемата фракция да се обработва с диалуминиев триоксид. По този начин всички съединения с киселинни свойства (мастни киселини и други) се задържат в точката на на капване и ивицата на стеролите се отделя ясно от ивицата на алифатните и тритерпеновите алкохоли.

5.2.2. В проявителната камера се налива до дълбочина около 1 cm смес от хексан и етилов етер (точка 4.24) (бележка 4). Камерата се затваря с подходящ капак и се оставя най-малко за половин час на хладно, 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 елуента. Това намалява времето за проявяване с приблизително една трета и осигурява по-равномерно и правилно елуиране на съставките.

*Бележка 4:* Необходимо е проявителната смес да се подменя за всяко изпитване, за да се получат напълно възпроизводими условия за елуиране; допуска се употребата на алтернативен разтворител 50:50 (V/V) n-хексан/етилов етер.

5.2.3. Приготвя се приблизително 5% разтвор на неосапуняемите съставки (точка 5.1.5) в етилацетат (точка 4.12) и с помощта на микроспринцовка с вместимост 100 µl 0,3 ml от разтвора се нанасят на тънка и равномерна ивица върху долния край (2 cm) на хроматографската плака (точка 5.2.1). На същото равнище като ивицата се капват 2 до 3 µl от референтния разтвор (точка 4.13.), така че ивицата на стеролите и тритерпеновите диалкохоли да може да бъде разпозната след проявяването.

5.2.4. Плаката се поставя в проявителната камера, приготвена съгласно изискванията в точка 5.2.2. Околната температура се поддържа между 15 и 20 °C (бележка 5). Камерата се затваря веднага с капаче и се оставя за елуиране, докато фронтът на разтворителя достигне приблизително 1 cm от горния ръб на плаката. След това плаката се изважда от проявителната камера и разтворителят се изпарява под струя горещ въздух или като плаката се остави за кратко време под камина.

*Бележка 5:* По-високата температура може да влоши разделянето.

5.2.5. Плаката се напръсква леко и равномерно с разтвора на 2,7-дихлорофлуоресцеин (точка 4.14), след което се оставя да изсъхне. Когато плаката се наблюдава под ултравиолетова светлина, ивиците на стеролите и тритерпеновите диалкохоли могат да се разпознаят, като се изравнят с петната, получени от референтния разтвор (точка 4.13). Границите на ивиците се очертават с черен молив по краищата на флуоресценцията (вж. фигура 3 относно плаките за тънкослойна хроматография).

5.2.6. Силикагелът в очертаните участъци се изгърква с помощта на метална шпатула. Отделеният надробен материал от силикагел се поставя във фунията за филтруване (точка 3.7). Прибавят се 10 ml горещ етилов ацетат (точка 4.12), разбърква се добре с металната шпатула и се филтрува под вакуум, като филтратът се събира в конусовидната колба (точка 3.8.), свързана с фунията за филтруване.

▼ **M26**

Утайката от фунията се промива три пъти с етилов етер (точка 4.3) (приблизително 10 ml всеки път) и филтратът се събира в същата колба, свързана с фунията; филтратът се изпарява до обем 4—5 ml и остатъчният разтвор се прехвърля в епруветка с вместимост 10 ml (точка 3.9.), която е била претеглена предварително; изпарява се до изсъхване чрез слабо подгряване под слаба струя азот; утайката се разтваря отново с няколко капки ацетон (точка 4.8), след което отново се изпарява до изсъхване.

Остатъкът в епруветката трябва да се състои от фракциите на стеролите и на тритерпеновите диалкохоли.

5.3. Приготвяне на триметилсилиловите етери.

5.3.1. В епруветката, съдържаща фракцията на стеролите и тритерпена, се добавя реагентът за силилиране (точка 4.25) (бележка 6) в съотношение 50 µl за всеки милиграм стероли и тритерпенови диалкохоли, като се избягва проникването на влага (бележка 7).

*Бележка 6:* Готови за употреба разтвори могат да се доставят от търговската мрежа. Могат да се доставят и други реагенти за силилиране, като например бистриметил-силилтрифлуороацетамид + 1% триметилхлоросилан, който трябва да се разрежда със същия обем безводен пиридин.

Пиридинът може да се замени със същото количество ацетонитрил.

5.3.2. Епруветката се затваря и внимателно се разклаща (без да се преобръща) до пълно разтваряне на съставките. Остава се за да престои най-малко 15 минути при стайна температура, след което се центрофугира в продължение на няколко минути. Бистрият разтвор е готов за анализ чрез газова хроматография.

*Бележка 7:* Слабата опалесценция, която може да се получи, е нормална и не причинява аномалии. Формирането на бял флокулат или появата на розово оцветяване е знак за наличието на влага или за увреждането на реагента. Ако това се случи, анализът трябва да бъде повторен (само ако се използва хексаметилдисилазан/ триметилхлоросилан).

5.4. Анализ чрез газова хроматография

5.4.1. Предварителни операции, кондициониране на капилярната колона.

5.4.1.1. Колоната (точка 3.11) се монтира в газовия хроматограф чрез свързване на входния край с инжектора с разделяне и на изходния край — с детектора.

Извършва се обща проверка на газохроматографския агрегат (течове от газовите вериги, ефикасност на детектора, ефикасност на разделителната система и на записващата система и т.н.).

5.4.1.2. Ако колоната се използва за първи път, се препоръчва тя да бъде кондиционирана: през нея се прокарява слаба струя газ, след което се включва газохроматографският агрегат и се започва постепенно нагряване до достигането на температура от поне 20 °C над температурата за експлоатация (бележка 8). Тази температура се поддържа в продължение на най-малко два часа, след което целият агрегат се привежда в работен режим (настройка на газовата струя и разделяне, възпламеняване на пламъка, свързване с изчислителната система, настройване на температурата на колоната, детектора и инжектора и т.н.) и след това се записва сигналът с поне два пъти по-висока чувствителност от тази, която ще се използва при анализа. Ходът на базовата линия трябва да е прав, без пикове от какъвто и да било вид и без измествания.

▼ **M26**

Отрицателното праволинейно изместване е показател за изтичане от свързките на колоната, а положителното изместване — за нейното неподходящо кондициониране.

*Бележка 8:* Температурата на кондициониране трябва винаги да е поне с 20 °C по-ниска от максималната температура, определена за използваната неподвижна фаза.

## 5.4.2. Избор на условия за работа

## 5.4.2.1. Условията за работа са следните:

- температура на колоната:  $260 \pm 5$  °C,
- температура на инжектора: 280—300 °C,
- температура на детектора: 280—300 °C,
- линейна скорост на газа носител: хелий — 20 до 30 cm/s, водород — 30 до 50 cm/s,
- коефициент на разделяне: 1:50 до 1:100,
- чувствителност на инструмента: 4 до 16 пъти минималното намаляване,
- чувствителност на записване: 1 до 2 mV от пълната скала,
- количество на инжектираното вещество: 0,5 до 1 µl от разтвора на триметилсилилови етери.

Тези условия могат да се изменят в зависимост от характеристиките на колоната и на газовия хроматограф с цел да се получат хроматограми, отговарящи на следните изисквания:

- времето на задържане на β-ситостерола трябва да е  $20 \pm 5$  минути,
- пикът на кампестерола трябва да е, както следва: за маслиното масло (средно съдържание 3%) —  $20 \pm 5\%$  от пълната скала, за соевото масло (средно съдържание 20%) —  $80 \pm 10\%$  от пълната скала,
- всички налични стероли трябва да са разделени. В добавка към изискването за разделяне на пиковите те трябва да бъдат напълно отделени един от друг, т.е. следата на всеки пик трябва да се върне напълно до основата, преди да се издигне за следващия пик. Допуска се обаче непълно отделяне, при условие че пикът при RRT 1,02 (ситостанол) може да се изрази количествено чрез използването на перпендикуляр.

## 5.4.3. Провеждане на анализа

## 5.4.3.1. С помощта на микроспринцовката 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 изтегля, за да се изпразни иглата. Иглата се въвежда през мембраната на инжектора и след една до две секунди разтворът се инжектира бързо, като иглата се изважда бавно след приблизително пет секунди.

Също така може да се използва автоматичен инжектор.

## 5.4.3.2. Записването продължава до пълното елуиране на триметилсилиловите етери на наличните тритерпенови диалкохоли. Базовата линия трябва да продължи да отговаря на изискванията (точка 5.4.1.2).

## 5.4.4. Идентифициране на пиковите

Идентифицирането на отделните пикове се извършва съгласно времената на задържане и чрез сравнение със сместа от стероли и триметилсилилови етери на тритерпеновите диалкохоли, анализирани при същите условия (вж. допълнението).



▼ **M26**

Стеролите и тритерпеновите диалкохоли се елуират в следния ред: холестерол, брасикастерол, ергостерол, 24-метилхлестерол, кампестерол, кампестанол, стигмастерол,  $\Delta 7$ -кампестерол,  $\Delta 5,23$ -стигмастадиенол, клеростерол,  $\beta$ -ситостерол, ситостанол,  $\Delta 5$ -авенастерол,  $\Delta 5,24$ -стигмастадиенол,  $\Delta 7$ -стигмастенол,  $\Delta 7$ -авенастерол, еритродиол и уваол.

Времената на задържане за  $\beta$ -ситостерол за колони SE-52 и SE-54 са посочени в таблица 1.

Типичните хроматограми за някои масла са показани на фигури 1 и 2.

## 5.4.5. Количествена оценка.

5.4.5.1. С помощта на изчислителната система се намира площта на пиковите на  $\alpha$ -холестанола и на стеролите и тритерпеновите диалкохоли. Пиковите за всички съединения, които не са включени (ергостеролът не трябва да се изчислява) в таблица 1, не се вземат под внимание. Корекционният фактор за  $\alpha$ -холестанола се приема за равен на 1.

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

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

където:

$A_x$  = площта на пика на стерол  $x$  в единиците, използвани от изчислителната система,

$A_s$  = площта на пика на  $\alpha$ -холестанола в единиците, използвани от изчислителната система,

$m_s$  = масата на добавения  $\alpha$ -холестанол в милиграми,

$m$  = масата на използваната за определянето проба в грамове.

## 6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

6.1. Индивидуалните концентрации на стеролите се докладват в mg/kg мастно вещество, а сборът им — като общо количество на стеролите.

Компонентният състав на всеки отделен стерол, както и на еритродиола и уваола, се изразяват до един знак след десетичната запетая.

Общият компонентен състав на стеролите трябва да бъде изразен без десетична запетая.

▼ **M28**

6.2. Изчислява се процентното съдържание на всеки отделен стерол чрез съотношението на площта на относимия пик спрямо общата площ на пиковите на стеролите:

$$\text{sterol}_x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

където:

$A_x$  = площта на пика на  $x$ ;

$\sum A$  = общата площ на пиковите на стеролите.

▼ **M26**

6.3. Привиден  $\beta$ -ситостерол:  $\Delta 5,23$ -стигмастадиенол + клеростерол +  $\beta$ -ситостерол + ситостанол +  $\Delta 5$ -авенастерол +  $\Delta 5,24$ -стигмастадиенол.

**▼M26**

6.4. Изчислява се процентът на еритродиола и уваола:

$$\text{еритродиол} + \text{уваол} = \frac{Er + Uv}{Er + Uv + \Sigma A} \times 100$$

където:

$\Sigma A$  = общата площ на пиковете на стеролите в единиците, използвани от изчислителната система,

ER = площта на пика на еритродиола в единиците, използвани от изчислителната система,

Uv = площта на пика на уваола в единиците, използвани от изчислителната система.

▼ **M26***Допълнение***Определяне на линейната скорост на газа**

В газовия хроматограф, настроен на нормални условия за работа, се инжектират 1 до 3  $\mu\text{l}$  метан (или пропан) и се измерва времето, необходимо за преминаване на метана (или пропана) през колоната от момента на инжектиране до появата на пика ( $t_M$ ).

Линейната скорост на газа в  $\text{cm/s}$  е представена чрез  $L/t_M$ , където  $L$  е дължината на колоната в сантиметри, а  $t_M$  е измереното време в секунди.

Таблица 1

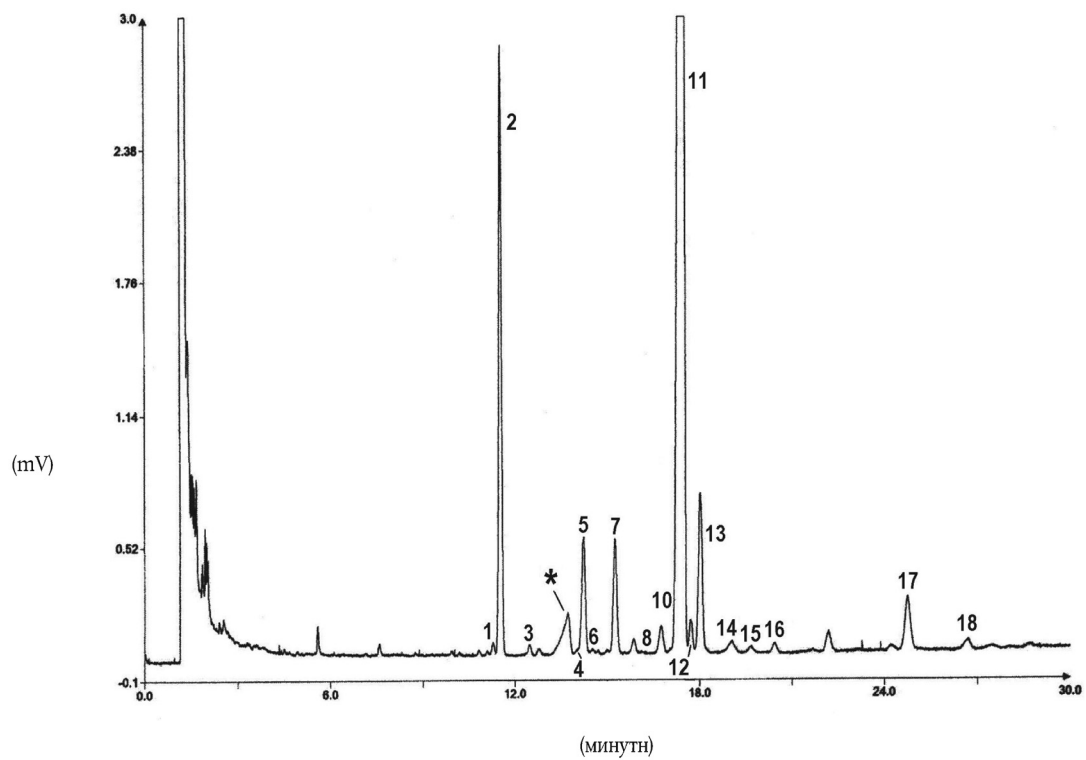
**Относително време на задържане на стеролите**

Пик	Идентификация		Относително време на задържане	
			SE 54 колона	SE 52 колона
1	холестерол	$\Delta 5$ -холестен- $3\beta$ -ол	0,67	0,63
2	холестанол	$5\alpha$ -холестан- $3\beta$ -ол	0,68	0,64
3	брасикастерол	[24S]-24-метил- $\Delta 5,22$ -холестадиен- $3\beta$ -ол	0,73	0,71
*	ергостерол	[24S]-24 метил-D5,7,22-холестатриен- $3\beta$ -ол	0,78	0,76
4	24-метиленхолестерол	24-метилен- $\Delta 5,24$ -холестадиен- $3\beta$ -ол	0,82	0,80
5	кампестерол	(24R)-24-метил- $\Delta 5$ -холестен- $3\beta$ -ол	0,83	0,81
6	кампестанол	(24R)-24-метилхолестан- $3\beta$ -ол	0,85	0,82
7	Стигмастерол	(24S)-24-етил- $\Delta 5,22$ -холестадиен- $3\beta$ -ол	0,88	0,87
8	$\Delta 7$ -кампестерол	(24R)-24-метил- $\Delta 7$ -холестен- $3\beta$ -ол	0,93	0,92
9	$\Delta 5,23$ -стигмастадиенол	(24R,S)-24-етил- $\Delta 5,23$ -холестадиен- $3\beta$ -ол	0,95	0,95
10	клеростерол	(24S)-24-етил- $\Delta 5,25$ -холестадиен- $3\beta$ -ол	0,96	0,96
11	$\beta$ -ситостерол	(24R)-24-етил- $\Delta 5$ -холестен- $3\beta$ -ол	1,00	1,00
12	ситостанол	24-етилхолестан- $3\beta$ -ол	1,02	1,02
13	$\Delta 5$ -авенастерол	(24Z)-24-етилиден- $\Delta$ -холестен- $3\beta$ -ол	1,03	1,03
14	$\Delta 5,24$ -стигмастадиенол	(24R,S)-24-етил- $\Delta 5,24$ -холестадиен- $3\beta$ -ол	1,08	1,08
15	$\Delta 7$ -стигмастенол	(24R,S)-24-етил- $\Delta 7$ -холестен- $3\beta$ -ол	1,12	1,12
16	$\Delta 7$ -авенастерол	(24Z)-24-етилиден- $\Delta 7$ -холестен- $3\beta$ -ол	1,16	1,16
17	еритродиол	$5\alpha$ -олеан-12-ен- $3\beta 28$ -диола	1,41	1,41
18	уваол	$\Delta 12$ -урсен- $3\beta 28$ -диола	1,52	1,52

## ▼ M26

Фигура 1

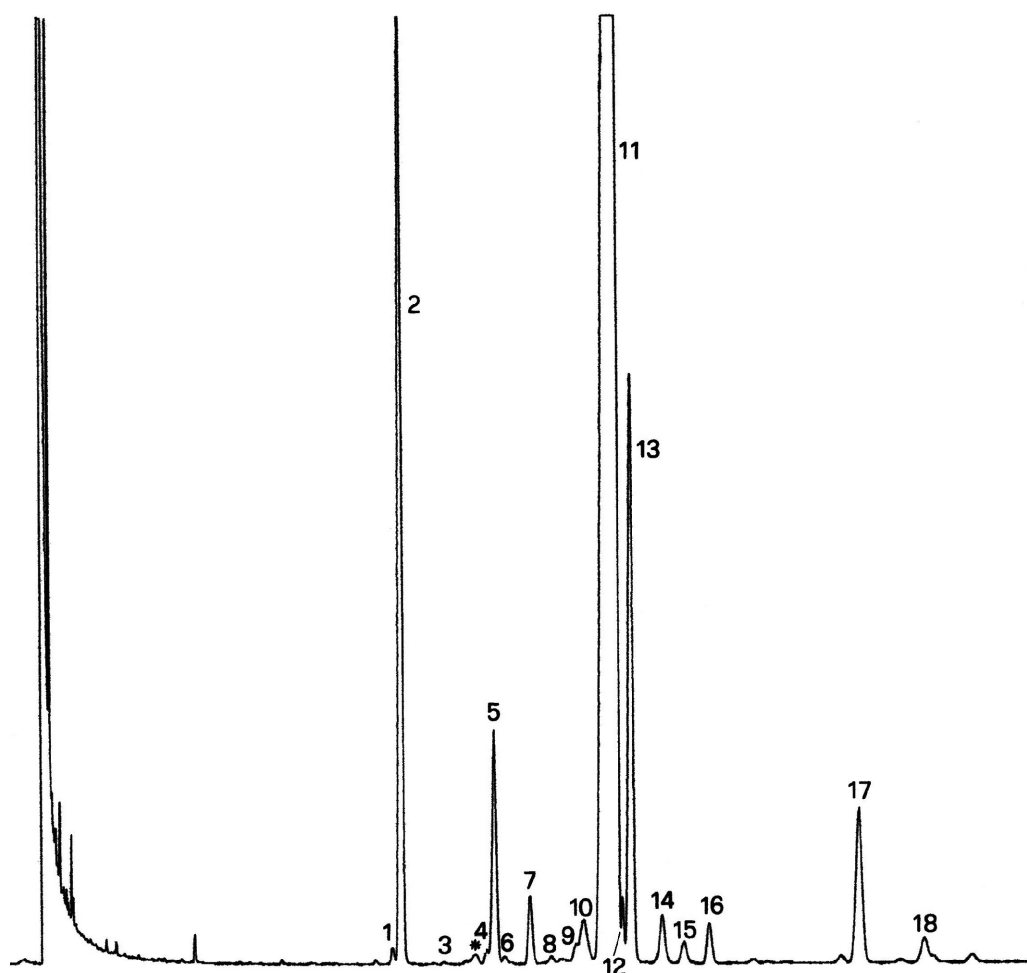
Газова хроматограма на фракцията на стеролите и тритерпеновите диалкохоли на маслиново масло за осветление (с добавен вътрешен стандарт)



▼ M26

Фигура 2

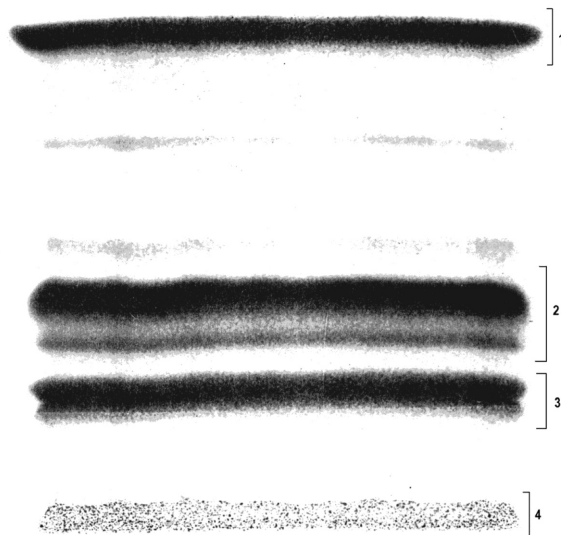
Газова хроматограма на фракцията на стеролите и тритерпеновите диалкохоли на рафинирано маслиново масло (с добавен вътрешен стандарт)



▼ **M26**

Фигура 3

Плака за тънкослойна хроматография на маслиново масло от остатъчен материал с участъка, който трябва да бъде изтърган с оглед определянето на стеролите и тритерпеновите диалкохоли



- 1 – сквален
- 2 – тритерпенови и алифатни алкохоли
- 3 – стероли и тритерпенови диалкохоли
- 4 – начало и свободни мастни киселини.

▼ **M21***ПРИЛОЖЕНИЕ VII***ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРОЦЕНТОТО 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 трисхидрокси-метиламинометан, 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 % фенолфталенин.

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, процедурирайте по следния начин: поставете 1 ml разтвор (5.1.2) в предварително приготвените с 3 ml n-хексан патрони.)

След перколация 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 разклащате 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 центрофугирайте 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 C<sub>54</sub> 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

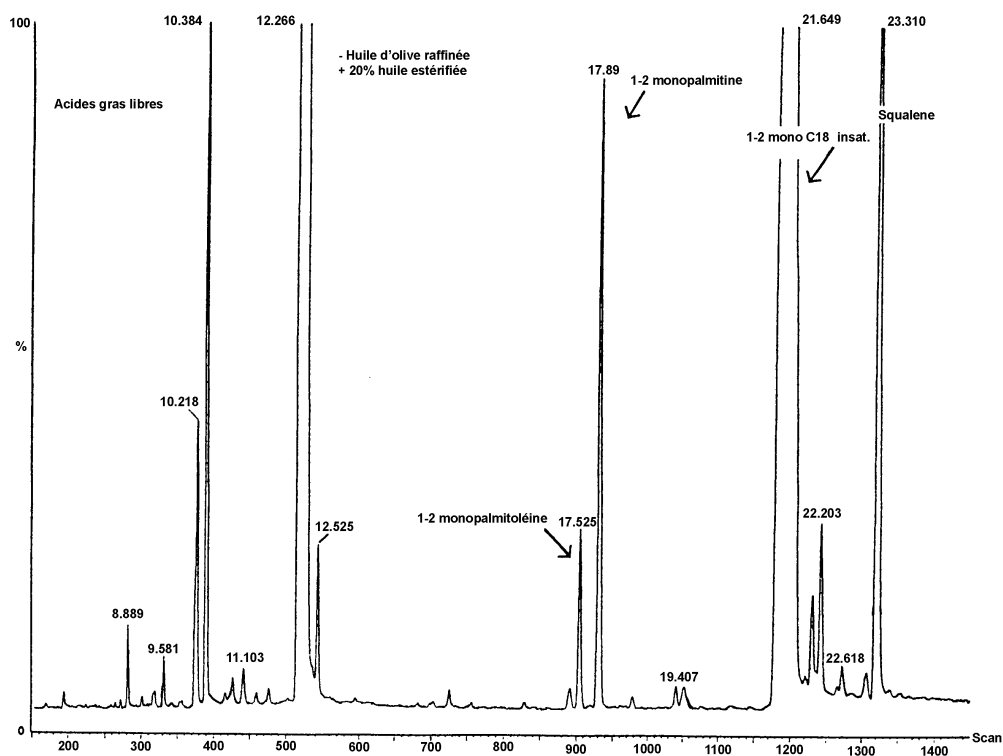
Протоколът от анализа следва да посочва:

- 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 C<sub>18</sub> insat.“ = 1-2 моно C<sub>18</sub> ненаситени; „squalene“ = скуален

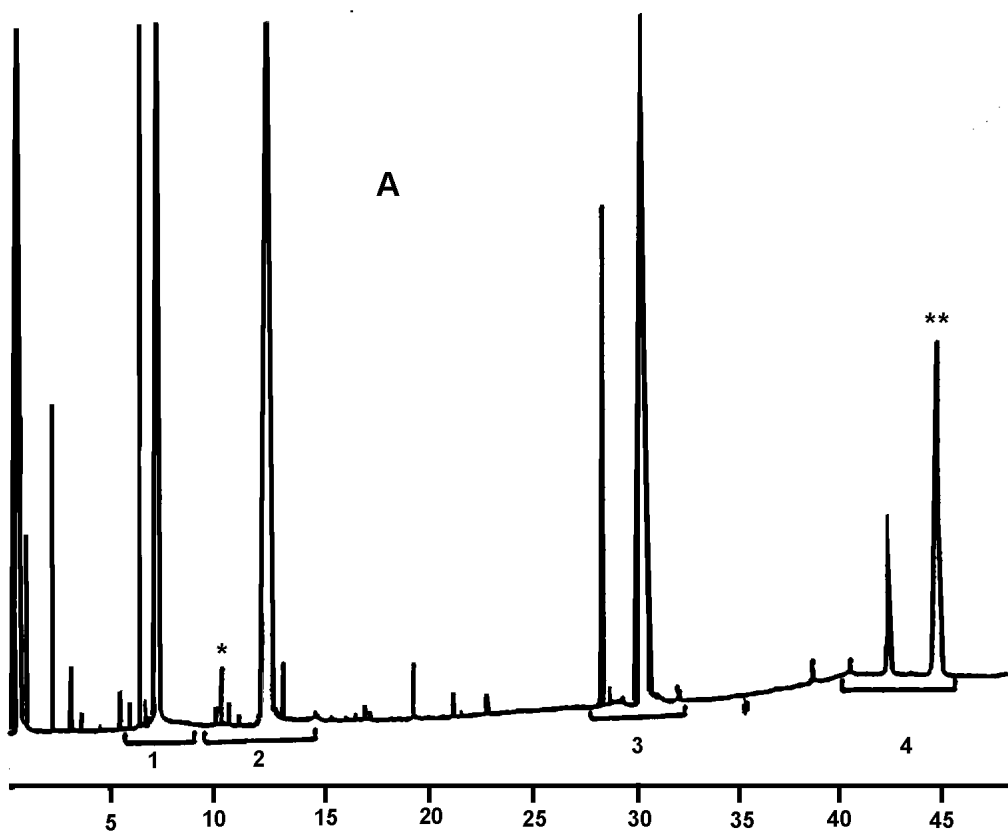
## ▼ M21

Фигура 2

Хроматограма на:

A) неестерифицирано маслиново масло, след липаза; след силинизация; 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:

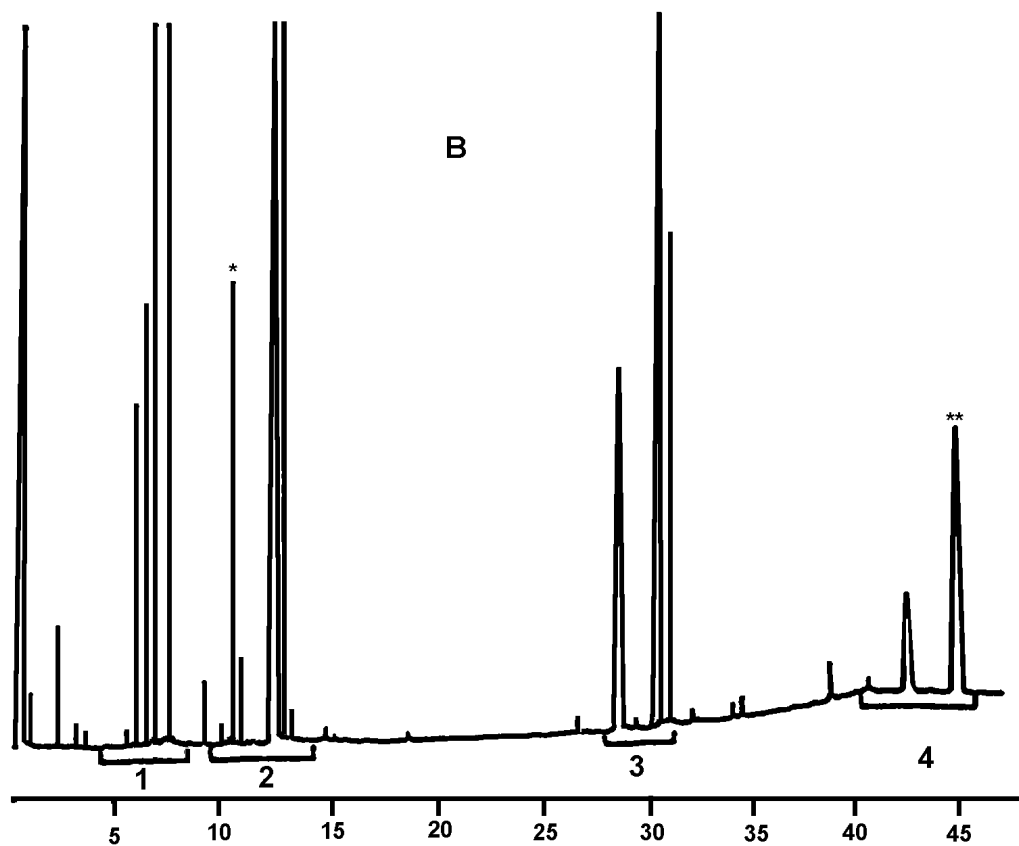
- 1 = Свободни мастни киселини
- 2 = Моноглицериди
- 3 = Диглицериди
- 4 = Триглицериди
- \* = 2-монопалмитин
- \*\* = Триглицерид C<sub>54</sub>

▼ 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 C<sub>54</sub>

▼ **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 рН метъра и спиралната бъркалка.

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

Добавете един обем водна суспензия на липазен прах (0,1 g/ml липаза). Веднага щом рН метърът покаже рН 8,3, включете хронометъра и добавете разтвора на натриевия хидроокис, капка по капка, така че да се поддържа рН 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 рН. 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**

## 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 при дължините на вълните, упоменати в метода, е вследствие на системи от конюгирани диени и триени, проявяващи се в резултат на процеси на окисляване и/или практики на рафиниране. Тези абсорбции са изразени като специфични екстинкции  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  (екстинкцията на 1 % разтвор (w/v) на мазнината в упоменатия разтворител, в кювета 10 mm), обикновено обозначавани като К (наричан още „коэффициент на екстинкция“).

## 1. ОБХВАТ

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

## 2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Проба се разтваря в нужния разтворител и абсорбцията на разтвора се определя при определени дължини на вълната срещу чистия разтворител.

Изчисляват се специфичните екстинкции при 232 nm и 268 nm в изооктан или при 232 nm и 270 nm в циклохексан за концентрация от 1 % w/v в кювета 10 mm.

## 3. ОБОРУДВАНЕ

3.1. Спектрофотометър, подходящ за извършване на измервания при ултравиолетови дължини на вълната (от 220 nm до 360 nm), с възможност за отчитане на отделните нанометрични единици. Препоръчва се редовна проверка на точността и възпроизводимостта на абсорбцията и скалите за дължина на вълната, както и за разсеяна светлина.

3.1.1. *Скала за дължина на вълната:* Тя може да се провери с помощта на референтен материал, състоящ се от филтър от оптично стъкло, съдържащ холмиев оксид или разтвор на холмиев оксид (запечатан или не), който има ясно разграничени абсорбционни ивици. Референтните материали са предназначени за проверка и калибриране на скалите за дължина на вълната на спектрофотометри във видимата и ултравиолетовата област с номинални ширини на спектралната ивица 5 nm или по-малко. Измерванията се извършват спрямо празна проба въздух в диапазона от дължини на вълната от 640 до 240 nm, според указанията, приложени към референтните материали. Извършва се корекция на базисната линия с празна траектория на лъча при всяка промяна на ширината на процеп. Дължините на вълната на стандарта са изброени в сертификата на референтния материал.

3.1.2. *Скала за абсорбция:* Тя може да се провери, като се използват налични в търговската мрежа запечатани референтни материали, състоящи се от подкислени разтвори на калиев дихромат, при някои концентрации и сертифицирани стойности на абсорбция при неговото  $\lambda_{\text{max}}$  (от 4 разтвора на калиев дихромат в перхлорна киселина, запечатани в четири ултравиолетови кварцови кювети за измерване на линейността и референтната фотометрична точност в ултравиолетовата област). Разтворите на калиев дихромат се измерват спрямо празна проба на използваната киселина, след корекция на базисната линия, съгласно указанията, приложени към референтния материал. Стойностите на абсорбция са изброени в сертификата на референтния материал.

С оглед на проверката на отклика на фотоклетката и фотоумножителя може да се постъпи и по следния начин: претеглят се 0,2000 g чист калиев хромат за спектрофотометрия и се разтварят 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.



▼ **M28**

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

- 3.2. Кварцови кювети с правоъгълно сечение, с капачки, подходящи за измервания на дължини на вълната в ултравиолетовия спектър (220 до 360 nm), с оптичен път от 10 mm. Когато се напълнят с вода или друг подходящ разтворител, кюветите не трябва да показват помежду си разлики по-големи от 0,01 екстинкционни единици.
- 3.3. Мерителни колби с резка с обем 25 ml, клас А.
- 3.4. Аналитична везна, която позволява отчитане с точност до 0,0001 g.

## 4. РЕАКТИВИ

По време на анализа, освен ако е посочено друго, се използват само реактиви, признати като „чисти за анализ“, и дестилирана или деминерализирана вода, или вода с еквивалентна степен на чистота.

Разтворител: изооктан (2,2,4-триметилпентан) за измерването при 232 nm и 268 nm и циклохексан за измерването при 232 nm и 270 nm, с абсорбция по-малка от 0,12 при 232 nm и по-малка от 0,05 при 270 nm спрямо дестилирана вода, измерена в кювета 10 mm.

## 5. ПРОЦЕДУРА

- 5.1. Пробата трябва да е напълно хомогенна и без суспендирани неочиствания. В противен случай тя трябва да се филтрува през хартия при температура приблизително 30 °C.
- 5.2. Измерват се прецизно приблизително 0,25 g (с точност до 1 mg) от така подготвената проба в 25-милилитрова 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 филтрува през хартия.

*БЕЛЕЖКА:* По принцип маса от 0,25—0,30 g е достатъчна за измерване на абсорбция на необработено маслиново масло и необработено маслиново масло екстра качество при 268 nm и 270 nm. За измерване при 232 nm, обикновено се изисква проба от 0,05 g, поради което обикновено се приготвят два отделни разтвора. За измервания на абсорбция на маслинови масла от остатъчен материал, рафинирани маслинови масла и маслинови масла с примеси обикновено е необходима по-малка проба, напр. 0,1 g, поради тяхната по-висока абсорбция.

- 5.3. Ако е необходимо, се коригира базисната линия (220—290 nm) с разтворител в двете кварцови кювети (с проба и референтна), след това кварцовата кювета с пробата се напълва с изпитвания разтвор и се измерва екстинкцията при 232, 268 или 270 nm спрямо референтния разтворител.

Записаните стойности на екстинкцията трябва да са в рамките от 0,1 до 0,8 или в рамките на интервала на линейност на спектрофотометъра, който следва да бъде проверен. В противен случай измерванията трябва да се повторят, като според нуждата се използват по-концентрирани или по-разредени разтвори.

- 5.4. След измерване на абсорбцията при 268 или 270 nm се измерва абсорбцията при  $\lambda_{max} + 4$  и  $\lambda_{max} - 4$ . Тези стойности на абсорбцията се използват за определяне на вариацията на специфичната екстинкция ( $\Delta K$ ).

*БЕЛЕЖКА:*  $\lambda_{max}$  се приема за 268 nm за изооктан, използван като разтворител, и 270 nm за циклохексан.

**▼ M28**

## 6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- 6.1. Записват се специфичните екстинкции (коэффициенти на екстинкция) при различните дължини на вълната, изчислени по следния начин:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s}$$

където:

$K\lambda$  = специфичната екстинкция при дължина на вълната  $\lambda$ ;

$E\lambda$  = екстинкцията, измерена при дължина на вълната  $\lambda$ ;

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

$s$  = дължина на пътя на кварцовата кювета, в cm;

с точност до два знака след десетичната запетая.

- 6.2. Вариация на специфичната екстинкция ( $\Delta K$ )

Вариацията на абсолютната стойност на екстинкцията ( $\Delta K$ ) се изчислява по следния начин:

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

където  $K_m$  е специфичната екстинкция при дължина на вълната за максимална абсорбция при 270 nm и 268 nm в зависимост от използвания разтворител.

Резултатите се изразяват с точност до два знака след десетичната запетая.

▼ **M28**

## ПРИЛОЖЕНИЕ X

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МЕТИЛОВИ ЕСТЕРИ НА МАСТНИ КИСЕЛИНИ  
ЧРЕЗ ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ**

## 1. ОБХВАТ

В настоящото приложение са дадени указания за определяне чрез газова хроматография на свободни и свързани мастни киселини в растителни мазнини и масла след тяхното превръщане в метилови естери на мастни киселини (МЕМК).

Свързаните мастни киселини на триацилглицеролите (TAG) и, в зависимост от метода на естерификация, свободните мастни киселини (FFA) се превръщат в метилови естери на мастни киселини (МЕМК), които се определят чрез капилярна газова хроматография.

Методът, описан в настоящото приложение, позволява определянето на метиловите естери на мастни киселини от C<sub>12</sub> до C<sub>24</sub>, включително метилови естери на наситени, *цис*- и *транс*-мононенаситени и *цис*- и *транс*-полиненаситени мастни киселини.

## 2. ПРИНЦИП

Газовата хроматография се използва за количествен анализ на метилови естери на мастни киселини. Метиловите естери на мастни киселини се подготвят в съответствие с част А. След това те се инжектират в инжектора и се изпаряват в него. Разделянето на метиловите естери на мастни киселини се извършва в аналитични колони със специфична полярност и дължина. Пламъчно-йонизационен детектор (FID) се използва за откриване на метилови естери на мастни киселини. Условието на анализ са представени в част Б.

Може да се използва водород или хелий като газ носител (подвижна фаза) в газовата хроматография на метиловите естери на мастни киселини с пламъчно-йонизационен детектор. Водородът ускорява разделянето и дава по-резки пикове. Неподвижната фаза е микроскопичен слой на тънко течно покритие върху инертна твърда повърхност от кварц.

При преминаването си през капилярната колонка анализираните изпарени съединения взаимодействат с неподвижната фаза, която покрива вътрешната повърхност на колоната. Поради това различно взаимодействие на различни съединения, те елуират по различно време, което се нарича време на задържане на съединението за даден набор от параметри на анализа. Сравнението на времената на задържане се използва за идентификация на отделните съединения.

## ЧАСТ А

**ПРИГОТВЯНЕ НА МЕТИЛОВИТЕ ЕСТЕРИ НА МАСТНИТЕ  
КИСЕЛИНИ ОТ МАСЛИНОВО МАСЛО И МАСЛИНОВО МАСЛО  
ОТ ОСТАТЪЧЕН МАТЕРИАЛ**

## 1. ОБХВАТ

В настоящата част се определя приготвянето на метиловите естери на мастните киселини. Тя включва методи за приготвянето на метилови естери на мастните киселини от маслиново масло и маслиново масло от остатъчен материал.

## 2. ПРИЛОЖНО ПОЛЕ

Приготвянето на метилови естери на мастни киселини от маслинови масла и маслинови масла от остатъчен материал се извършва чрез *транс*-естерификация с метанолов разтвор на калиев хидроксид при стайна температура. Необходимостта от пречистване на пробата преди *транс*-естерификацията зависи от съдържанието на свободни мастни киселини в пробата и аналитичния параметър, който следва да бъде определен, той може да се избира в съответствие със следната таблица:

## ▼ M28

Категория масло	Метод
Необработено маслиново масло с киселинност $\leq 2,0$ %	1. Мастни киселини 2. <i>Транс</i> -мастни киселини 3. ΔECN 42 (след пречистване със силикагел чрез ТФЕ)
Рафинирано маслиново масло	
Маслиново масло, съставено от рафинирано масло и необработени маслинови масла	
Рафинирано маслиново масло от остатъчен материал	
Маслиново масло от остатъчен материал	
Необработено маслиново масло с киселинност $> 2,0$ % Сурово маслиново масло от остатъчен материал	1. Мастни киселини (след пречистване със силикагел чрез ТФЕ) 2. <i>Транс</i> -мастни киселини (след пречистване със силикагел чрез ТФЕ) 3. ΔECN42 (след пречистване със силикагел чрез ТФЕ)

## 3. МЕТОДОЛОГИЯ

3.1. **Транс-естерификация с метанолов разтвор на калиев хидроксид при стайна температура**3.1.1. *Принцип*

Метиловите естери се образуват чрез *транс*-естерификация с метанолов разтвор на калиев хидроксид като междинен етап преди да се извърши осапуняването.

3.1.2. *Реактиви*

3.1.2.1. Метанол със съдържание на не повече от 0,5 % (m/m) вода.

3.1.2.2. Хексан с качество за хроматография.

3.1.2.3. Хептан с качество за хроматография.

3.1.2.4. Диетилов етер, стабилизирани за анализ.

3.1.2.5. Ацетон с качество за хроматография.

3.1.2.6. Разтворител за елуиране, за пречистване на маслото чрез колонна хроматография/ТФЕ, смес от хексан/диетилов етер в съотношение 87/13 (v/v).

3.1.2.7. Калиев хидроксид, приблизително 2M метанолов разтвор: разтварят се 11,2 g калиев хидроксид в 100 ml метанол.

3.1.2.8. Патрони силикагел — 1 g (6 ml) за твърдофазна екстракция.

3.1.3. *Апаратура*

3.1.3.1. Епруветки с отвор на винт (с вместимост 5 ml ) с капачка със снадка от политетрафлуоретилен.

3.1.3.2. Градуирани или автоматични пипети, 2 ml и 0,2 ml.

▼ **M28**3.1.4. *Пречистване на пробите масло*

При необходимост пробите се пречистват чрез преминаване на маслото през патрон силикагел за твърдофазна екстракция. Патрон силикагел (3.1.2.8) се поставя в апарат за вакуумно елуиране и се промива с 6 ml хексан (3.1.2.2); промиването се извършва без вакуум. След това разтвор на маслото (приблизително 0,12 g) в 0,5 ml хексан (3.1.2.2) се зарежда в колоната. Разтворът се прекарва през колоната и след това се елуира с 10 ml хексан/диетилов етер (87:13 v/v) (3.1.2.6). Комбинираните елуати се хомогенизират и се разделят на две еднакви по обем части. Една алиquotна част се изпарява до изсъхване в ротационен изпарител при понижено налягане при стайна температура. Остатъкът се разтваря в 1 ml хептан и разтворът е готов за анализ на мастни киселини чрез газова хроматография. Втората алиquotна част се изпарява и остатъкът се разтваря в 1 ml ацетон за анализ на триглицеридите чрез ВЕТХ при необходимост.

3.1.5. *Процедура*

В епруветка с отвор на винт с вместимост 5 ml (3.1.3.1) се претегля приблизително 0,1 g от пробата от маслото. Добавят се 2 ml (3.1.2.2) хептан и се разклаща. Добавят се 0,2 ml метанолов разтвор на калиев хидроксид (3.1.2.7), поставя се капачката със снадка от политетрафлуороетилен, затяга се и се разклаща енергично в продължение на 30 секунди. Остава се да се разслои до избистряне на горния слой от разтвора. Декантира се горният слой, който съдържа метиловите естери. Хептановият разтвор е готов за инжектиране в газовия хроматограф. Препоръчва се разтворът да се запази в хладилника до анализа чрез газова хроматография. Не се препоръчва съхраняване на разтвора в продължение на повече от 12 часа.

## ЧАСТ Б

**АНАЛИЗ НА МЕТИЛОВИ ЕСТЕРИ НА МАСТНИ КИСЕЛИНИ ЧРЕЗ ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ**1. **ОБХВАТ**

В настоящата част се дават общи насоки за прилагането на капиларна газова хроматография за определяне на качествения и количествен състав на сместа от метилови естери на мастните киселини, получени в съответствие с метода, указан в част А.

Частта не е приложима за полимеризирани мастни киселини.

2. **РЕАКТИВИ**2.1. **Газ носител**

Инертен газ (хелий или водород), щателно подсушен и с кислородно съдържание по-малко от 10 mg/kg.

*Бележка 1:* Водородът 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 онечиствания.

2.2.2. Въздух или кислород, свободен от органични онечиствания.

2.2.3. Азот (чистота  $> 99\%$ ).

2.3. **Референтен еталон**

Смес от метилови естери на чисти мастни киселини или метиловите естери на мазнина с известен състав, за предпочитане сходен с този на мастното вещество, което ще се анализира. *Цис-* и *транс-*изомерите на метилови естери на октадеценова, октадекадиенова и октадекатриенова киселина са полезни за идентифициране на *транс-*изомери на ненаситени киселини.

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

▼ **M28****3. АПАРАТУРА**

Дадените инструкции се отнасят до обикновеното оборудване, използвано за газова хроматография, включващо капилярни колонки и пламъчно-йонизационен детектор.

**3.1. Газов хроматограф**

Газовият хроматограф се състои от следните елементи.

**3.1.1. Система за инжектиране**

Използва се инжекционна система с капилярни колонки, като в този случай системата за инжектиране следва да е специално проектирана за използване с такива колонки. Тя може да е с колонен инжектор от тип със или без разделяне на пробата.

**3.1.2. Пещ**

Пещта трябва да е в състояние да нагрява капилярната колонка до температура от поне 260 °C и да поддържа желаната температура с точност до 0,1°C. Последното изискване е особено важно, когато се използва епруветка 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. Капилярна колона**

3.1.3.1. Тръба, изготвена от материал, инертен към веществата, които ще се анализират (обикновено от стъкло или кварц). Вътрешният диаметър трябва да е между 0,20 и 0,32 mm. Вътрешната повърхност следва да се обработи по подходящ начин (напр. подготовка на повърхността, инактивация), преди да се запълни с покритието от неподвижната фаза. Дължина 60 m е достатъчна за мастни киселини и *цис*- и *транс*- изомери на мастните киселини.

3.1.3.2. Подходящи са колонки с неподвижна фаза полярен полисилоксан (цианопропилсиликон) омержен (напречно свързан).

*Бележка 2:* Съществува риск полярните полисилоксани да създадат трудности при разпознаването и разделянето на линоленовата киселина и киселините с C20.

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

**3.1.3.3. Сглобяване и кондициониране на колонката**

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

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

*Бележка 3:* Предварително кондиционирани по подходящ начин колонки се предлагат в търговската мрежа.

**3.1.4. Пламъчно-йонизационен детектор и усилвателен преобразувател.****3.2. Спринцовка**

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

**3.3. Система за събиране на данни**

Система за събиране на данни, свързана онлайн с детекторите и използвана със софтуерна програма, подходяща за интегриране на пиковите и нормализиране.

▼ **M28****4. ПРОЦЕДУРА**

Дейностите, описани в точки 4.1.—4.3, се отнасят до използването на пламъчно-йонизационен детектор.

**4.1. Условия на изпитване****4.1.1. Избор на оптимални условия на работа за капилярни колони**

Предвид ефикасността и пропускливостта на капилярните колонки разделянето на различните съставки и времетраенето на анализа в голяма степен зависят от скоростта на потока на газа носител в колонката. Следователно ще е необходимо да се оптимизират условията на работа чрез коригиране на този параметър (или просто — към намаляване на налягането на колонката) в зависимост от това дали се цели подобряването на разделянето или извършването на по-бърз анализ.

Следните условия се оказали подходящи за разделяне на метилови естери на мастни киселини (C<sub>4</sub>—C<sub>26</sub>). Примери на хроматограми са показани в допълнение Б:

температура на инжектора:	250 °C
температура на детектора:	250 °C
температура на пещта:	165 °C (8 min) до 210 °C при 2 °C/min
газ носител водород:	входно налягане на колоната, 179 kPa
общ поток:	154,0 ml/min;
съотношение на разделяне:	1:100
обем на впръскване:	1 µl

**4.1.2. Определяне на разделителната способност (вж. допълнение А)**

Изчисляване на разделителната способност R, на два съседни пика I и II, използвайки формулата:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)}) / (\omega_{(I)} \omega_{(II)})) \text{ или } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{(I)} \omega_{(II)})) \text{ (USP) (Фармакопея на САЩ),}$$

или

$$R = 1,18 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)})) \text{ (EP, BP, JP, DAB), (JP (Фармакопея на Япония), EP (Европейска фармакопея), (BP (Фармакопея на Великобритания))}$$

където:

$d_{r(I)}$  е разстоянието на задържане на пик I;

$d_{r(II)}$  е разстоянието на задържане на пик II;

$t_{r(I)}$  е времето на задържане на пик I;

$t_{r(II)}$  е времето на задържане на пик II;

$\omega_{(I)}$  е широчината на основата на пик I;

$\omega_{(II)}$  е широчината на основата на пик II;

$\omega_{0,5}$  е широчината на пика на посоченото съединение, при средата на височината на пика;

Ако  $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$ , да се изчисли R, като се използват следните формули:

$$R = (d_{r(II)} - d_{r(I)}) / \omega = (d_{r(II)} - d_{r(I)}) / 4\sigma$$

където:

$\sigma$  е стандартното отклонение (вж. допълнение А, фигура 1).

▼ **M28**

Ако разстоянието  $d_T$  между двата пика  $d_{T(II)} - d_{T(I)}$  е равно на  $4\sigma$ , разделителната способност  $R = 1$ .

Ако два пика не са напълно разделени, допирателните към инфлексните точки на двата пика се пресичат в точка С. За да бъдат напълно разделени двата пика, разстоянието между тях трябва да бъде равно на:

$$d_{T(II)} - d_{T(I)} = 6 \sigma \text{ откъдето } R = 1,5 \text{ (вж. допълнение А, фигура 3).}$$

## 5. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

### 5.1. Качествен анализ

Разпознават се пиковете на метиловите естери за пробата от хроматограмата в допълнение Б, фигура 1, ако е необходимо чрез интерполация или чрез сравнение с тези на референтните смеси на метиловите естери (както е посочено в точка 2.3).

### 5.2. Количествен анализ

#### 5.2.1. Определяне на състава

Изчислява се масовата част  $w_i$  на отделните метилови естери на мастни киселини, изразена в проценти от масата на метиловите естери, както следва:

#### 5.2.2. Метод на 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 процента, представляващ площта на съответния пик, отнесена към сбора от площите на всички пикове, при използване на следната формула:

$$w_i = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

където:

$A_i$  е площта под пика на отделния метилов естер на мастна киселина  $i$ ;

$\Sigma A$  е сборът от площите под всички пикове на всички отделни метилови естери на мастни киселини.

Резултатите се изразяват с точност до две цифри след десетичната запетая.

*Бележка 4:* За мазнини и масла масовата част на метиловите естери на мастни киселини е равна на масовата част на триацилглицеролите в грамове на 100 g. За случаите, в които това допускане не се позволява, вж. 5.2.2.2.

##### 5.2.2.2. Използване на корекционни коефициенти

В определени случаи, например при наличието на мастни киселини с по-малко от осем въглеродни атома или на киселини с вторични групи, площите се коригират със специфични корекционни коефициенти ( $F_{ci}$ ). Тези коефициенти се определят за всеки един инструмент. За тази цел трябва да се използват подходящи референтни материали със сертифициран състав на мастни киселини в съответния обхват.

*Бележка 5:* Тези корекционни коефициенти не са идентични с теоретичните корекционни коефициенти за FID, които се посочват в допълнение А, тъй като те включват и параметрите на инжекционната система и др. Въпреки това, в случаите на по-големи разлики следва да бъдат проверени параметрите на цялата система.



▼ **M28**

За тази референтна смес, процентното съотношение на метилов естер на мастни киселини  $i$  е представено от формулата:

$$w_i = (m_i / \Sigma m) \times 100$$

където:

$m_i$  е масата на метиловия естер на мастни киселини  $i$  в референтната смес;

$\Sigma m$  е общият сбор на масите на различните компоненти като метилови естери на мастни киселини в референтната смес.

От хроматограмата на референтната смес се изчислява процентът на площта за метилов естер на мастни киселини  $i$  както следва:

$$w_i = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

където:

$A_i$  е площта на метилов естер на мастни киселини  $i$  в референтната смес;

$\Sigma A$  е сумата от всички площи на всички метилови естери на референтната смес.

Съответно корекционният коефициент  $F_c$  е

$$F_c = (m_i \times \Sigma A) / (A_i \times \Sigma m)$$

За извадката, процентът от масата на всеки метилов естер на мастни киселини  $i$  е:

$$w_i = (F_i \times A_i) / \Sigma (F_i \times A_i)$$

Резултатите се изразяват до две цифри след десетичната запетая.

*Бележка 6:* Изчислената стойност съответства на процента от масата на отделните мастни киселини, изчислени като триацилглицероли на 100 g мазнини.

## 5.2.2.3. Използване на вътрешен стандарт

При определени анализи (например, когато не са определени количествено всички мастни киселини, например 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 мастна киселина в дадена проба) е необходимо да се използва вътрешен стандарт. Често се използват мастни киселини с 5, 15 или 17 въглеродни атома. Трябва да се определи корекционният коефициент (ако има такъв) за вътрешния стандарт.

Процентното съотношение по маса на компонента  $i$ , изразено като метилови естери, тогава се дава чрез формулата:

$$w_i = (m_{IS} \times F_i \times A_i) / (m \times F_{IS} \times A_{IS})$$

където:

$A_i$  е площта на метилов естер на мастни киселини  $i$ ;

$A_{IS}$  е площта на вътрешния стандарт;

$F_i$  е корекционният коефициент на мастната киселина  $i$ , изразена като метилов естер на мастни киселини;

$F_{IS}$  е корекционният коефициент на вътрешния стандарт;

$m$  е масата, в милиграми, на изпитваната проба

$m_{IS}$  е масата, в милиграми, на вътрешния стандарт

Резултатите се изразяват с точност до две цифри след десетичната запетая.

**▼ M28****6. ПРОТОКОЛ ОТ ИЗПИТВАНЕТО**

Протоколът от изпитването следва да описва методите, използвани за приготвянето на метиловите естери и за анализа чрез газова хроматография. Също така той трябва да включва всички подробности около извършването, които не са упоменати в настоящия стандартен метод, или разгледани като незадължителни, както и подробности относно всички инциденти, които може да са повлияли на резултатите.

Протоколът от изпитването трябва да съдържа всички необходими данни за пълната идентификация на пробата.

**7. ТОЧНОСТ****7.1. Резултати от междулабораторно изпитване**

Подробности за междулабораторно изпитване относно прецизността на метода са дадени в приложение В към стандарт ИОС/Т.20/Дос. № 33. Стойностите, получени от това междулабораторно изпитване може да не са приложими към концентрационни обхвати и матрици, различни от посочените.

**7.2. Повторяемост**

Абсолютната разлика между два независими единични резултата от изпитване, получени чрез използването на един и същ метод върху идентичен изпитван материал, в една и съща лаборатория, от един и същ оператор, чрез използването на едно и също оборудване, в кратък интервал от време, не трябва да надвишава в повече от 5 % от случаите  $r$  от таблиците 1—14 в приложение В към стандарт ИОС/Т.20/Дос. № 33.

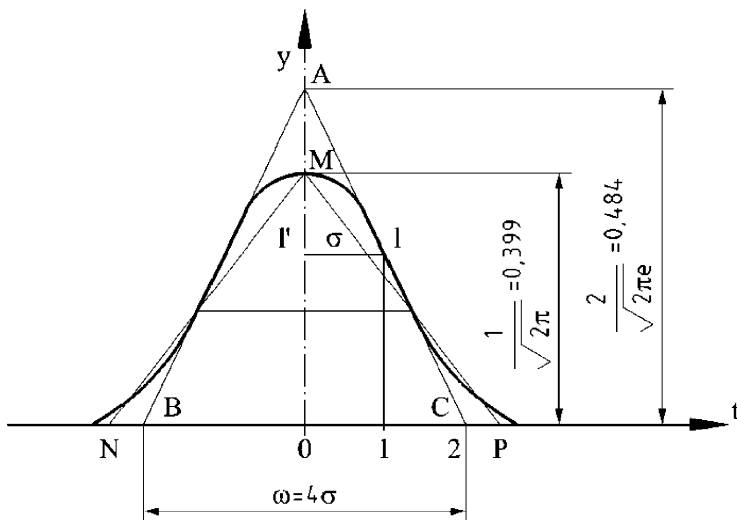
**7.3. Възпроизводимост**

Абсолютната разлика между два независими единични резултата от изпитване, получени чрез използването на един и същ метод върху идентичен изпитван материал, в различни лаборатории, от различни оператори, чрез използването на различно оборудване, не трябва да надвишава в повече от 5 % от случаите  $R$  от таблиците 1—14 в приложение В към стандарт ИОС/Т.20/Дос. № 33.

▼ M28

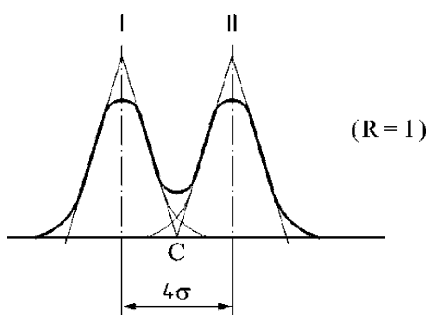
Допълнение А

Фигура 1

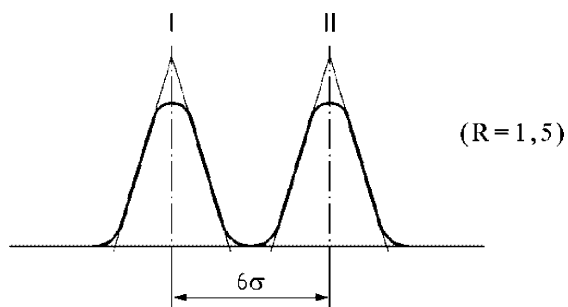


$\omega_{0.5}$  е широчината при средата на височината на триъгълника (ABC) и  $b$  е широчината при средата на височината на триъгълника (NPM).

Фигура 2



Фигура 3

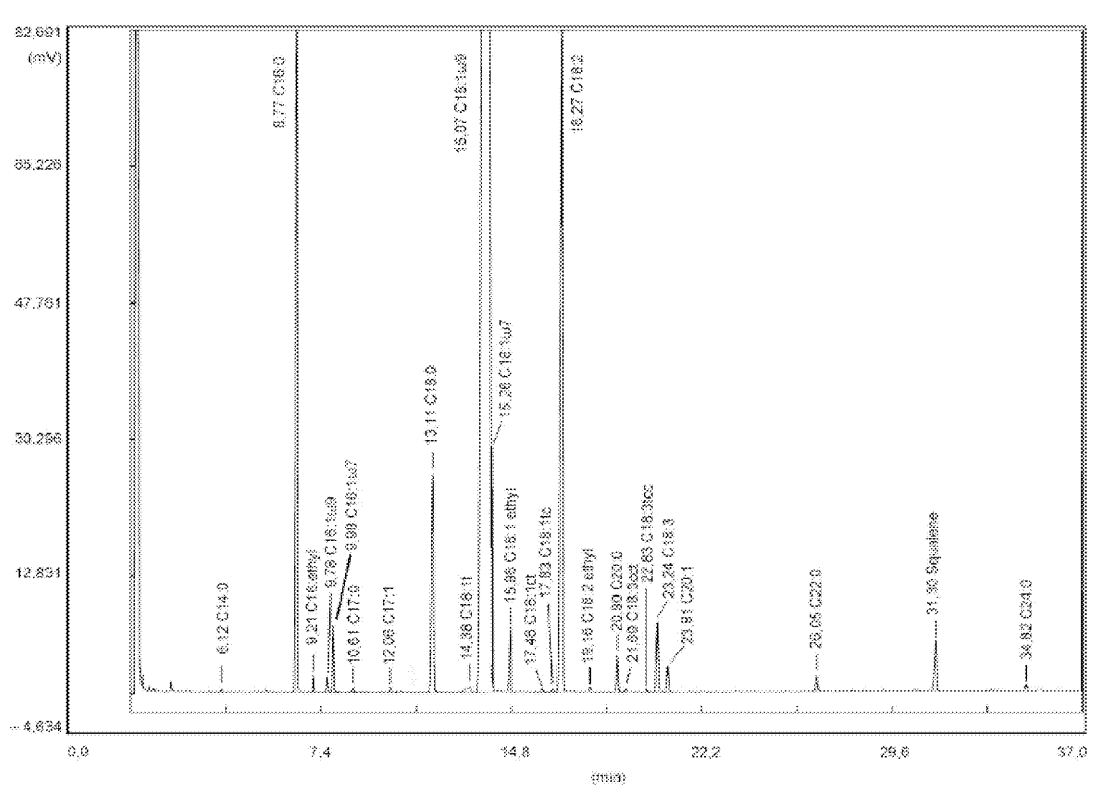


▼ M28

Допълнение Б

Фигура 1

Газово-хроматографски профил, получен по метода на метилиране на студено от маслиново масло от остатъчен материал.



Хроматографските пикове съответстват на метиловите и етиловите естери, освен ако е посочено друго.



## 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 пиковете 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.

▼ M26

## ПРИЛОЖЕНИЕ XII

МЕТОД ЗА ОРГАНОЛЕПТИЧНА ОЦЕНКА НА НЕОБРАБОТЕНО  
МАСЛИНОВО МАСЛО НА МЕЖДУНАРОДНИЯ СЪВЕТ ЗА  
МАСЛИНОВИТЕ ПРОДУКТИ (ЮС)▼ M28

## 1. ЦЕЛ И ОБХВАТ

Целта на описания в настоящото приложение международно използван метод е да се установи процедурата за оценка на органолептичните характеристики на необработеното маслиново масло по смисъла на част VIII, точка 1 от приложение VII към Регламент (ЕС) № 1308/2013 на Европейския парламент и на Съвета <sup>(1)</sup> и да се определи методът за неговото класифициране въз основа на посочените характеристики. Методът съдържа също така указания за незадължително етикетирание.

Описаният метод се прилага само за необработеното маслиново масло и за неговото класифициране или етикетирание в зависимост от интензитета на разграничените недостатъци и на плодовия аромат, определени от група подбрани, обучени и проверени дегустатори, които работят в група.

Посочените в настоящото приложение стандарти на ЮС се използват в тяхната последна налична редакция.

▼ M26

## 2. ОСНОВНИ ОБЩИ ПОНЯТИЯ, ИЗПОЛЗВАНИ ПРИ СЕТИВНИЯ АНАЛИЗ

Вж. стандарт ЮС/Т.20/Дос. № 4 — „Сетивен анализ — основни общи понятия“

## 3. СПЕЦИФИЧНИ ПОНЯТИЯ

## 3.1. Отрицателни признаци

*Мухъл/кални отлагания* характерен вкус на масло, което е получено от маслини, складирано на купчини или съхранявано при такива условия, че са достигнали напреднал стадий на анаеробна ферментация, или на масло, което е било в контакт с отложена в бъчви и подземни цистерни кал, и в което също се е развил процес на анаеробна ферментация.

*Плесен/влага/пръст* характерен вкус на масло, получено от маслини, в които са се развили големи количества плесен и дрожди поради съхранението на плодовете на влага в продължение на няколко дни, или на масло, получено от маслини, които при събирането си са били замърсени с пръст или кал и не са били измити.

*Винен/оцетен/кисел/горчив* характерен за някои масла вкус, който напомня на вино или оцет. Той се дължи най-вече на образуването на оцетна киселина, етилацетат и етанол в резултат на аеробната ферментация на маслините или маслиновата паста, оставени върху непочистени подложки за пресоване.

*Гранивост* вкус на масло, преминало през интензивен процес на окисляване.

*Замръзнали маслини (влажна дървесина)* характерен вкус на масло, извлечено от маслини, които са били замръзнали още на дървото.

<sup>(1)</sup> Регламент (ЕС) № 1308/2013 на Европейския парламент и на Съвета от 17 декември 2013 г. за установяване на обща организация на пазарите на селскостопански продукти и за отмяна на регламенти (ЕИО) № 922/72, (ЕИО) № 234/79, (ЕО) № 1037/2001 и (ЕО) № 1234/2007 на Съвета (ОВ L 347, 20.12.2013 г., стр. 671).

▼ **M28**3.1.1. *Други отрицателни признаци*

<i>Заоплено или прегоряло</i>	Характерен вкус на масло, предизвикан от прекалено и/или продължително загряване при обработката, особено при термично смесване на пастата, ако този процес е извършен при неподходящи температурни условия.
<i>Сено—дърво</i>	Характерен вкус на някои масла, получени от изсъхнали маслини.
<i>Блудкав</i>	Усещане за плътност и кашкавост в устата, което създават някои стари масла.
<i>Грес</i>	Вкус на масло, който напомня вкуса на газьол, смазочни материали или минерални масла.
<i>Зеленчуци вода</i>	Вкус, придобит от масло в резултат на продължителен контакт със зеленчукова вода, в която е започнал процес на ферментация.
<i>Саламура</i>	Вкус на масло, извлечено от маслини, които са били съхранявани в солена разтвор.
<i>Металически</i>	Вкус, който напомня метал. Характерен е за масло, което е престояло в продължителен контакт с метални повърхности при намачкването, смесването, пресването или съхранението.
<i>Коило</i>	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 били изработени от зелено или сушено коило.
<i>С вкус на ларви</i>	Вкус на масло, получено от маслини, които са били сериозно засегнати от ларвата на маслиновата мушичка ( <i>Bactrocera oleae</i> ).
<i>Краставици</i>	Вкус, получен, когато маслото е стояло пакетирано херметически прекалено дълго, най-вече в тенекени кутии и който се дължи на образуването на 2,6-нонадиенал.

3.2. **Положителни признаци**

<i>Плодов аромат</i>	Съвкупност от характерни за маслото обонятелни възприятия, които зависят от сорта маслини и произхождат от здрави и пресни маслини — както узрели, така и неузрели. Той се възприема пряко и/или ретроназално.
<i>Горчивина</i>	Основен вкус, характерен за масло, получено от зелени маслини или от маслини в начален стадий на зреене. Той се възприема от жлебовидните папили във V-образната част на езика.
<i>Стипчивост</i>	Остро допирно усещане, характерно за масло, произведено предимно от все още неузрели маслини в началото на събиране на реколтата. Може да се възприеме в цялата устна кухина и особено в гърлото.

▼ **M29**3.3. **Незадължителни понятия за целите на етикетирането**

При поискване ръководителят на групата дегустатори може да удостовери, че оценените масла съответстват на определенията и скалите, които отговарят единствено на посочените по-долу термини в зависимост от интензитета и възприятието на признаците.

▼ **M29**

Положителни признаци (плодов аромат, горчивина и стипчивост): в зависимост от интензитета на възприемане:

- *Силен*, когато медианата на признака е по-висока от 6;
- *Умерен*, когато медианата на признака се намира между 3 и 6;
- *Деликатен*, когато медианата на признака е по-ниска от 3;

*Плодов аромат* Съвкупност от характерни за маслото обонятелни възприятия, която зависи от сорта маслини, произхожда от здрави и пресни маслини и в която не преобладава вкусът нито на зелените, нито на зрелите маслини. Тя се възприема пряко и/или ретроназално.

*Вкус на зелени маслини* Съвкупност от характерни за маслото обонятелни възприятия, която напомня зелени плодове, зависи от сорта маслини и произхожда от здрави и пресни зелени маслини. Тя се възприема пряко и/или ретроназално.

*Вкус на зрели маслини* Съвкупност от характерни за маслото обонятелни възприятия, която напомня зрели плодове, зависи от сорта маслини и произхожда от здрави и пресни маслини. Тя се възприема пряко и/или ретроназално.

*Добре балансирано* Масло, което не показва липса на баланс, т.е. обонятелно-вкусово и допирно усещане, при което медианата на признака „горчивина“ и тази на признака „стипчивост“ са с не повече от 2 пункта по-високи от медианата на признака „плодов аромат“.

*Масло с мек вкус* Масло, за което медианата на признаците „горчивина“ и „стипчивост“ е равна на 2 или е по-ниска.

Списък на термините в зависимост от интензитета на възприемане:

Термини, за които следва да се представи сертификат за органолептично изпитване	Медиана на признака
Плодов аромат	—
Вкус на зрели маслини	—
Вкус на зелени маслини	—
Деликатен плодов аромат	По-малко от 3
Умерен плодов аромат	Между 3 и 6
Силен плодов аромат	Над 6
Деликатен вкус на зрели маслини	По-малко от 3
Умерен вкус на зрели маслини	Между 3 и 6
Силен вкус на зрели маслини	Над 6
Деликатен вкус на зелени маслини	По-малко от 3



▼ **M29**

Термини, за които следва да се представи сертификат за органолептично изпитване	Медиана на признака
Умерен вкус на зелени маслини	Между 3 и 6
Силен вкус на зелени маслини	Над 6
Деликатна горчивина	По-малко от 3
Умерена горчивина	Между 3 и 6
Силна горчивина	Над 6
Деликатна стипчивост	По-малко от 3
Умерена стипчивост	Между 3 и 6
Силна стипчивост	Над 6
Добре балансирано масло	Медианата на признака „горчивина“ и медианата на признака „стипчивост“ са с не повече от 2 пункта по-високи от медианата на признака „плодов аромат“.
Масло с мек вкус	Медианата на признака „горчивина“ и медианата на признака „стипчивост“ са с не повече от 2

▼ **M26**

## 4. ЧАША ЗА ДЕГУСТАЦИЯ НА МАСЛИНОВО МАСЛО

Вж. стандарт ИОС/Т.20/Дос. № 5 — „Чаша за дегустация на маслиново масло“

## 5. ИЗПИТВАТЕЛНО ПОМЕЩЕНИЕ

Вж. стандарт ИОС/Т.20/Дос. № 6 — „Ръководство за оборудване на изпитвателното помещение“

## 6. ПОМОЩНИ СРЕДСТВА

Описание на по-долу помощни средства, необходими за правилното изпълнение на поставените на дегустаторите задачи, трябва да са налице във всяка от кабините и до тях да е осигурен лесен достъп:

- чаши (стандартни), съдържащи мострите, които са означени със съответния код; чашите са покрити с часовниково стъкло и се съхраняват при  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- профилиращ лист (вж. фигура 1) — на хартия или, ако условията относно профилиращия лист са изпълнени, в електронен формат, заедно с указания за използването му (при необходимост);
- химикалка или незаличимо мастило;
- подноси с резени ябълка и/или вода, газирана вода и/или сухари;
- чаша вода при стайна температура;
- лист, припомнящ основните правила, посочени в раздели 8.4 и 9.1.1;
- плювалници.

**▼ M26****7. ГРУПА ДЕГУСТАТОРИ — РЪКОВОДИТЕЛ И УЧАСТНИЦИ****7.1. Ръководител на групата**

Ръководителят на групата трябва да е преминал подходящо обучение и да разполага с експертни знания за видовете масла, на които ще попада по време на работата си. Той е основната фигура в групата и отговаря за нейната организация и функциониране.

За работата на ръководителя на групата дегустатори е необходимо основно обучение в инструментите за сетивен анализ, сетивни умения, щателен подход към подготовката, организацията и провеждането на изпитванията, както и умения и търпение за планирането и научното провеждане на изпитванията.

Ръководителят единствен носи отговорност за подбора, обучението и наблюдението на дегустаторите с оглед установяване на тяхното ниво на компетентност. Поради това неговата отговорност е да поставя оценка на дегустаторите, която трябва винаги да е обективна; за целта той разработва специфични процедури, основани на изпитвания и солидни критерии за приемане и отхвърляне. Вж стандарт ИОС/Т.20/Дос. № 14 — „Ръководство за подбор, обучение и наблюдение на квалифицирани дегустатори на необработено маслиново масло“.

Ръководителят на групата отговаря за качеството на нейната работа, а оттам — и за оценката на нейните членове, във връзка с която трябва да предостави надеждни и обективни доказателства. При всички случаи той трябва да е в състояние да докаже във всеки един момент своя контрол върху прилагания метод и върху дегустаторите. Препоръчва се групата дегустатори да се подлага на периодично калибриране (ИОС/Т.20/Дос. № 14 § 5).

Ръководителят е изцяло отговорен за воденето на отчетността на групата. Отчетността трябва да е винаги проследима. Ръководителят трябва да осигури спазването на изискванията за гаранции и качество, определени в международните стандарти за сетивен анализ, както и анонимността на пробите по всяко време.

Ръководителят отговаря за инвентаризацията и гарантира, че апаратурата и оборудването, които са необходими за спазването на спецификациите на този метод, са добре почистени и поддържани, и съхранява писмени доказателства за това, както и за спазването на условията за провеждане на изпитването.

Ръководителят отговаря за приемането и съхраняването на пробите при пристигането им в лабораторията, както и за тяхното съхраняване след провеждане на изпитването. Във връзка с това той гарантира във всеки един момент, че пробите остават анонимни и са надлежно съхранени, като за тази цел трябва да разработи писмени процедури, гарантиращи проследимостта и надеждността на целия процес.

Наред с това ръководителят отговаря за изготвянето, кодирането и представянето на пробите на дегустаторите съгласно подходящ план на изследването в съответствие с предварително установени протоколи, както и за събирането и статистическата обработка на получените от дегустаторите данни.

Ръководителят отговаря за разработването и изготвянето на всички други процедури, които могат да се окажат необходими за допълване на този стандарт и за осигуряване на правилното функциониране на групата.

Ръководителят трябва да потърси начини за сравнение на получените от групата резултати с резултатите, получени от други групи за анализ на необработено маслиново масло, за да установи дали групата функционира правилно.

**▼ M26**

Ръководителят на групата дегустатори е длъжен да мотивира нейните членове, като насърчава интереса, любознателността и духа на състезателност сред тях. С оглед на това настоятелно се препоръчва да се осигури безпрепятствен двупосочен поток на информация с членовете на групата, като им се предоставя информация за всички възложени задачи и за получените резултати. Наред с това ръководителят взема мерки становището му да не става известно и се грижи по-активните членове на групата да не налагат своите критерии над останалите дегустатори.

Ръководителят свиква дегустаторите достатъчно рано и отговаря на запитвания относно провеждането на изпитванията, но се въздържа от каквото и да било становище относно пробите.

**▼ M28**7.1.1. *Заместник ръководител на групата*

Ръководителят на групата може, по обосновани съображения, да бъде заменен от заместник ръководител на групата, който може да поеме задълженията относно провеждането на изпитванията. Този заместник трябва да разполага с всички необходими умения, които се изискват от ръководител на група.

7.2. **Дегустатори**

Лицата, работещи като дегустатори при органолептични изпитвания на маслинови масла, трябва да го правят на доброволна основа. Поради това се препоръчва кандидатите да подадат заявление в писмена форма. Те се подбират, обучават и наблюдават от ръководителя на групата в съответствие с уменията им да разграничават сходни проби; трябва да се има предвид, че точността им се подобрява чрез обучение.

Дегустаторите трябва да действат като обективни наблюдатели на органолептичните качества, като се абстрахират от личните си вкусове и отчитат единствено своите възприятия. За тази цел те трябва винаги да работят в мълчание, на спокойствие и без да бързат, като обръщат възможно най-голямо внимание на органолептичните качества на дегустираната проба.

За всяко изпитване са необходими между 8 и 12 дегустатори, но е разумно да има няколко резервни, които да заместят евентуалните отсъстващи.

**▼ M26**

## 8. УСЛОВИЯ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА АНАЛИЗА

8.1. **Представяне на пробата**

Пробата маслиново масло за анализ се представя в стандартни чаши за дегустация, отговарящи на стандарт ИОС/Т.20/Дос. № 5 — „Чаша за дегустация на маслиново масло“.

Чашата трябва да съдържа 14—16 ml масло (или 12,8—14,6 g, ако пробите се претеглят) и да е покрита с часовниково стъкло.

Всяка чаша е обозначена с код, съставен от цифри или комбинация от букви и цифри, избрани на случаен принцип. Кодът се поставя посредством безмирисна технология.

8.2. **Температура на изпитвателното помещение и на пробите**

По време на цялото изпитване предназначенията за дегустация проби маслиново масло се съхраняват в чашите при температура  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Тази температура е избрана, тъй като при нея наблюдението на органолептичните различия се извършва по-лесно, отколкото при стайна температура, и защото при по-ниски температури характерните за тези масла ароматни съединения се изпаряват слабо, докато по-високите температури благоприятстват образуването на летливи съединения, специфични за нагнетите масла. Вж. стандарт ИОС/Т.20/Дос. № 5 — „Чаша за дегустация на маслиново масло“ относно метода, който трябва да се използва за нагряването на поставените в чашата проби.

▼ **M26**

Температурата на изпитвателното помещение трябва да е между 20 °C и 25 °C (вж. ИОС/Т.20/Дос. № 6).

8.3. **Време за провеждане на анализите**

Най-подходящото време за дегустация на масла е сутрин. Доказано е, че през деня има периоди на оптимална сетивност по отношение на вкуса и обонянието. В периода преди хранене обонятелно-вкусовата възприемчивост нараства, докато след хранене тя намалява.

С този критерий обаче не бива да се злоупотребява, тъй като е възможно чувството за глад да отклони дегустаторите от задачата им и да намали способността им да разграничават отделните проби; поради това се препоръчва дегустациите да се извършват между 10 часа сутринта и 12 по пладне.

8.4. **Общи правила за поведение на дегустаторите**

Изброените по-долу препоръки се отнасят за поведението на дегустаторите по време на работата им.

Когато дегустаторите получат покана от ръководителя на групата да участват в органолептично изпитване, те трябва да са в състояние да се явят в уговореното време и да спазват следните изисквания:

- Да не пушат или консумират кафе най-малко 30 минути преди предвидения час на започване на изпитването.
- Да не са използвали парфюм, козметичен продукт или сапун, чиято миризма не е изветряла до часа на започване на изпитването. За измиване на ръцете си дегустаторите трябва да използват неароматизиран сапун, като след това ги изплакват и подсушават толкова често, колкото се налага, с цел да бъдат отстранени всякакви миризми.
- Не трябва да са консумирали храна в продължение на поне един час преди провеждането на изпитването.
- В случай на физическо неразположение и най-вече ако е засегнато тяхното обоняние или вкус, или ако психическото им състояние не им позволява да се съсредоточат върху задачите, дегустаторите се оттеглят от дегустацията и уведомяват ръководителя на групата.
- Ако горните условия са спазени, дегустаторите заемат мястото си в отредените им кабинни организирано и тихо.
- Те прочитат внимателно указанията, отпечатани върху профилиращия лист, и започват да разглеждат пробата едва когато са напълно подготвени за изпълнението на поставената им задача (спокойно и без да бързат). При възникване на съмнения те се съветват поверително с ръководителя на групата.
- При изпълнение на задачите си дегустаторите трябва да пазят мълчание.
- Мобилните телефони на дегустаторите трябва да са изключени по всяко време, за да не се пречи на концентрацията и работата на колегите им.

9. **ПРОЦЕДУРА ОТНОСНО ОРГАНОЛЕПТИЧНАТА ОЦЕНКА И КЛАСИФИКАЦИЯТА НА НЕОБРАБОТЕНОТО МАСЛИНОВО МАСЛО**9.1. **Начин на дегустация**▼ **M29**

- 9.1.1. Дегустаторът поема чашата, като внимава тя да остава покрита с часовниковото стъкло, и леко я накланя; докато чашата е в това положение, той я завърта еднократно около оста ѝ, така че да се омокри възможно най-голяма повърхност от вътрешността ѝ. След това той отстранява часовниковото стъкло и помирисва пробата, като вдъшва бавно и дълбоко, за да оцени качествата на маслото. Помиришването не трябва да продължи повече от 30 секунди. Ако през това време не е оформено заключение, той прави кратка почивка, след което повтаря действието.

▼ **M29**

След завършване на обонятелното изпитване дегустаторът прави оценка на възприятията в устната кухина (цялостни ретроназално-обонятелни, вкусови и допирни възприятия). За тази цел той поема малка глътка масло от около 3 ml. Много важно е маслото да се разпредели по цялата устна кухина — от предната част на устата и езика, по протежение на двете страни, до задната част и основата на небцето и гърлото, тъй като е известен фактът, че интензитетът на вкусовете и допирните възприятия варира в зависимост от областта от езика, небцето и гърлото.

Трябва да се подчертае, че е много важно достатъчно количество от маслото да се разпространи много бавно върху задната част на езика към основата на небцето и гърлото, докато дегустаторът се съсредоточава върху поредността, в която се проявяват горчивите и стипчивите стимули. В противен случай има опасност и двата стимула да останат незабелязани при някои масла, или стипчивият стимул да надделее над горчивия.

Кратките последователни вдишвания през устата позволяват на дегустатора не само да разпространи пробата така, че да се покрие цялата уста, но също така да възприеме летливите ароматни съединения ретроназално, като предизвика възприятие по този път.

*NB:* когато дегустаторите не възприемат плодовия аромат в дадена проба и интензитетът на класифицирания отрицателен признак е 3,5 или по-малко, ръководителят на групата може да реши да осигури възможност дегустаторите да анализират пробата повторно при температура на околната среда (COI/T.20/Doc. № 6/Rev. 1, септември 2007 г., Раздел 3 — Общи спецификации за оборудване на помещение за изпитване), като същевременно се уточняват контекстът и концепцията за температура на околната среда. Когато температурата на пробата достигне температурата на помещението, дегустаторите следва да оценят повторно пробата, като проверят единствено дали се възприема плодовият аромат. Ако се възприема, те следва да отбележат интензитета по скалата.

Следва да се вземе предвид и възприятието за стипчивост при допир. За тази цел е препоръчително маслото да бъде погълнато.

▼ **M26**

9.1.2. Когато се извършва органолептична оценка на необработеното маслиново масло, се препоръчва по време на всяка дегустация да се прави оценка на не повече от ЧЕТИРИ ПРОБИ, като се проведат най-много три дегустации дневно, за да се избегне ефектът на контраст, който е възможен при незабавното дегустиране на други проби.

Тъй като последователните дегустации водят до умора или загуба на чувствителността в резултат на вече дегустираните проби, трябва да се използва продукт, който елиминира останалите от предходната дегустация количества масло в устата.

Препоръчва се използването на резенче ябълка, което след съвкване може да се изхвърли в плювалника. След това устата се изплаква с малко вода със стайна температура. Между края на дадена дегустация и началото на следващата трябва да изминат най-малко 15 минути.

## 9.2. Попълване на профилиращия лист от страна на дегустаторите

Профилиращият лист, попълван от дегустаторите, е посочен във фигура 1 от настоящото приложение.

Всеки дегустатор от групата помирихва и вкусува<sup>(1)</sup> изследваното масло. След това отбелязва интензитета, с който възприема всеки от отрицателните и положителните признаци, по 10-сантиметровата скала, фигурираща върху предоставения профилиращ лист.

<sup>(1)</sup> Дегустаторът може да реши да не вкусува масло, когато при непосредствено помиришване забележи изключително интензивен отрицателен признак — в този случай той отбелязва това извънредно обстоятелство върху профилиращия лист.

▼ **M26**

Ако дегустаторът установи наличието на отрицателни признаци, които не са изброени в раздел 4, той ги записва в графата „други“, като използва понятието или понятията, описващи най-точно тези признаци.

▼ **M28**9.3. **Използване на данните от страна на ръководителя на групата**

Ръководителят на групата събира профилиращите листове, попълнени от всеки дегустатор, и преглежда вписаните данни за интензитета по отношение на различните признаци. Ако установи аномалия, той приканва съответния дегустатор да преразгледа своя профилиращ лист и при необходимост да повтори изпитването.

Ръководителят на групата въвежда записаните от всеки дегустатор данни относно оценката в компютърна програма като предвидената в стандарт ИОС/Т.20/Дос. № 15, с цел статистическо изчисление на резултатите от анализа чрез изчисляване на тяхната медианна стойност. Вж. точка 9.4 и допълнението към настоящото приложение. Данните за дадена проба се вписват с помощта на матрица, която включва 9 колони, представляващи 9-те сетивни признака, и  $n$  на брой редове, представляващи участвалите  $n$  на брой дегустатори.

Когато най-малко 50 % от дегустаторите установят и запишат даден недостатък в графата „други“, ръководителят на групата изчислява медианата на този недостатък и изготвя съответната класификация.

Стойността на устойчивия коефициент на вариация, който определя класификацията (недостатък с най-силен интензитет и признак „плодов аромат“), не трябва да надвишава 20 %.

В противен случай ръководителят на групата трябва да повтори оценката на конкретната проба в рамките на друга дегустация.

При често възникване на такива случаи се препоръчва ръководителят на групата да организира специализирано допълнително обучение за дегустаторите (ИОС/Т.20/Дос. № 14, параграф 5) и да използва показателите за повторемост и отклонение, за да провери работата на дегустатора (ИОС/Т.20/Дос. № 14, параграф 6).

▼ **M29**9.4. **Класификация на маслото**

Маслото се класифицира в зависимост от медианата на недостатъците и медианата на признака „плодов аромат“. Медианата на недостатъците се определя като медианата на недостатъците, които се възприема с най-висок интензитет. Медианата на недостатъците и медианата на признака „плодов аромат“ се посочват с точност до един знак след десетичната запетая.

Класифицирането на маслото се осъществява, като се съпоставят стойностите на медианата на недостатъците и на медианата на признака „плодов аромат“ с референтните скали, посочени по-долу. Тъй като грешката на метода е взета предвид при определянето на границите на тези скали, те се считат за абсолютни. Използваните компютърни програми онагледяват класифицирането във вид на таблица със статистически данни или на графика.

- а) необработено маслиново масло екстра качество: медианата на недостатъците е равна на 0, а медианата на признака „плодов аромат“ е по-висока от 0;
- б) необработено маслиново масло: медианата на недостатъците е по-висока от 0, но не по-висока от 3,5, а медианата на признака „плодов аромат“ е по-висока от 0;
- в) необработено 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 „плодов аромат“ е равна на 0.

▼ **M29**

*Забележка 1:* когато медианата на признака „горчивина“ и/или „стипчивост“ е над 5,0, ръководителят на групата посочва тази информация върху сертификата от изпитването.

В случай на оценки, извършвани в рамките на проверки на съответствието, се извършва едно изпитване. В случай на насрещна оценка анализът трябва да се осъществи в две повторения с отделни дегустации. Резултатите от анализа в две повторения трябва да бъдат статистически хомогенни (вж. точка 9.5). Ако не са, пробата трябва да се анализира отново два пъти. Окончателната стойност на медианата на признаците за класифициране се изчислява, като се използва средноаритметичната стойност на двете медиани.

#### 9.5 Критерии за приемане и отхвърляне на повторения

Нормализираната грешка, определена по-долу, се използва, за да се определи дали двата резултата от анализа с две повторения са хомогенни или статистически приемливи:

$$E_n = \frac{|Me_1 - Me_2|}{\sqrt{U_1^2 + U_2^2}}$$

където  $Me_1$  и  $Me_2$  са медианите на двете повторения (съответно първи и втори анализ), а  $U_1$  и  $U_2$  са разширените неопределености, получени за двете стойности, изчислени както е посочено в допълнението, както следва:

$$U_1 = c \times s^* \text{ и } s^* = \frac{(CV_r \times Me_1)}{100}$$

За разширената неопределеност  $c = 1,96$ ; откъдето:

$$U_1 = 0,0196 \times CV_r \times Me_1$$

където  $CV_r$  е устойчивият коефициент на вариация.

За да бъде посочено, че двете получени стойности не са със статистически значими различия,  $E_n$  трябва да е по-малка или равна на 1,0.

▼ **M26***Допълнение***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 реално число  $X_m$ , което се характеризира от факта, че вероятността ( $p$ ) стойностите на разпределение ( $X$ ) да са по-ниски от въпросното число ( $X_m$ ) е равна на 0,5 или по-малка, като същевременно вероятността ( $p$ ) стойностите на разпределение ( $X$ ) да са равни на  $X_m$  или по-ниски, е равна на 0,5 или по-голяма. Съгласно по-практично определение медианата представлява 50-ият перцентил на разпределението на числа, подредени по възходящ ред. С други думи, тя е средната точка на последователна съвкупност от нечетен брой числа или средната стойност на двете средни точки на последователна съвкупност от четен брой числа.

**Устойчиво стандартно отклонение**

С оглед да се постигне надеждна приблизителна оценка на отклоненията от средната стойност е необходимо да се прибегне до метода на устойчивото стандартно отклонение на Stuart и Kendall (4). Формулата се отнася за асимптотичното устойчиво стандартно отклонение, т.е. устойчивата приблизителна оценка на отклонението на разглежданите данни, където  $N$  е броят наблюдения, а  $IQR$  — интерквартилният размах, който обхваща точно 50% от случаите при разпределение с дадена вероятност:

$$s^* = \frac{1,25 \times IQR}{1,35 \times \sqrt{N}}$$

Интерквартилният размах се получава, като се изчисли разликата между 75-ия и 25-ия перцентил.

$$IQR = 75 - \text{ипроцентил} - 25 - \text{ипроцентил}$$

където перцентилът е стойността  $X_{pc}$ , която се характеризира от факта, че вероятността ( $p$ ) разпределените стойности да са по-ниски от  $X_{pc}$  е равна на специфична процентна стойност или по-малка, като същевременно вероятността ( $p$ ) разпределените стойности да са равни на  $X_{pc}$  или по-малки е по-голяма или равна на тази на специфичната процентна стойност. Тази процентна стойност указва използваната част от разпределението. Конкретно за медианата тя е равна на 50/100.

$$\text{процентил} = [p(X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge p(X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

За практически цели перцентилът е стойността на разпределение, отговаряща на определена площ, очертана от кривата на разпределение или на плътност. Например 25-ият перцентил представлява стойността на разпределение, отговаряща на област, равна на 0,25 или 25/100.

При този метод перцентилите се изчисляват въз основа на реалните стойности, използвани в матрицата на данните (метод за изчисляване на перцентилите).

**Устойчив коефициент на вариация (%)**

Устойчивият коефициент на вариация ( $CV_r\%$ ) представлява безразмерно число, което указва процента на отклонение на съвкупността от анализирани числа. Ето защо той е много полезен за проверката на надеждността на оценителите в групата.

$$CV_r = \frac{s^*}{Me} \times 100$$



**▼ M26****Доверителни интервали на медианата при 95%**

Доверителните интервали при 95% (стойност на грешката от първи род, равна на 0,05 или 5%) са интервалите, в които стойността на медианата може да се променя при хипотезата, че е възможно опитът да бъде повторен неограничен брой пъти. В практиката те указват интервала на отклонение при изпитването в приетите условия на работа и при хипотезата, че то може да бъде повторено неограничен брой пъти. Както при случая със  $CVr\%$  интервалът помага да се оцени надеждността на изпитването.

$$C.I._{горен} = Me + (c \times s^*)$$

$$C.I._{долен} = Me - (c \times s^*)$$

където  $C = 1,96$  за доверителен интервал при равнище 95%.

Пример за изчислителна таблица е представен в приложение I към стандарт ИОС/Т 20/Doc. № 15.

*Литература*

- (1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL.SYSTAT Inc.
- (2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica. Maggioli Editore, Rimini.
- (3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook. Elsevier. Amsterdam.
- (4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1. Hafner Publishing Co.
- (5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots. The American Statistician, 32, (2), 12-16.
- (6) ИОС/Т.28/Doc. № 1 September 2007, Guidelines for the accreditation of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil according to standard ISO/IEC 17025:2005.
- (7) ИОС/Т.20/Doc. № 14.
- (8) ИОС/Т.20/Doc. № 14.
- (9) ISO/IEC 17025:05.

**▼ 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  $103 \pm 2$  °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 смилане 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 смесва и събира, смесва се внимателно и се анализира незабавно.

**2.2. Размер на пробата**

Веднага след извършването на операцията по смилане, 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  $103 \pm 2$  °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 подгриване. Настроява се скоростта на подгриване 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 смилва 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 подгриване. Последните следи от разтворителя се премахват чрез нагриване на колбата в пещта при  $103 \pm 2$  °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.

Нагрива 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 нагрива 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 повторемостта 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. Повторемост

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.



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 sodиев 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 sodиев триофосфатен разтвор (4.4.).

V<sub>1</sub> = е цифровата стойност на обема, в милилитри, на стандартния обемен sodиев триофосфатен разтвор (4.4.), използван за празната проба.

**▼B**

$V_2$  = е цифровата стойност на обема в милилитри, на стандартния обемен 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  $\pm 1$  °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 месеци, 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 неосапунащи 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  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  при намалено налягане, докато изсъхне.

**6.2. Отделяне на фракция от стероиден въгледород**

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 въгледороди (фигура 1а), а втората фракция – стероидните. По-нататъшното елюиране дава сквален и свързани с него съставки. За да се постигне добро сепариране между наситените и стероидните въгледороди, е необходимо да се оптимизират обемите на фракциите. За целта обеят на първата фракция се регулира така, че когато се анализира втората фракция максимумите, представляващи наситените въгледороди, да са ниски (виж фигура 1в); ако те не се появят, а интензитетът на стандартния максимум е нисък, трябва да се намали обеят. 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  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 kPa.

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-стигмастадиенът – след относително време на задържане от около 1,29 минути (виж фигура 1б). 3,5-стигмастадиенът 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 стигмастадиените 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 стигмастадиени можете да получите от анализа на рафинирано зеленчуково масло, като използвате по-малко количество мостра (1 до 2 грама). Стигмастадиените дават очебиен и лесно определяем максимум.

## 6.3.3. Количествен анализ

Съдържанието на стигмастадиени се определя по следната формула:

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

**▼M11**

където:  $A_s$  = зона на максимума на стигмастиенините (ако максимумът е решен в два изомера, сумирайте зоните на двата максимума),

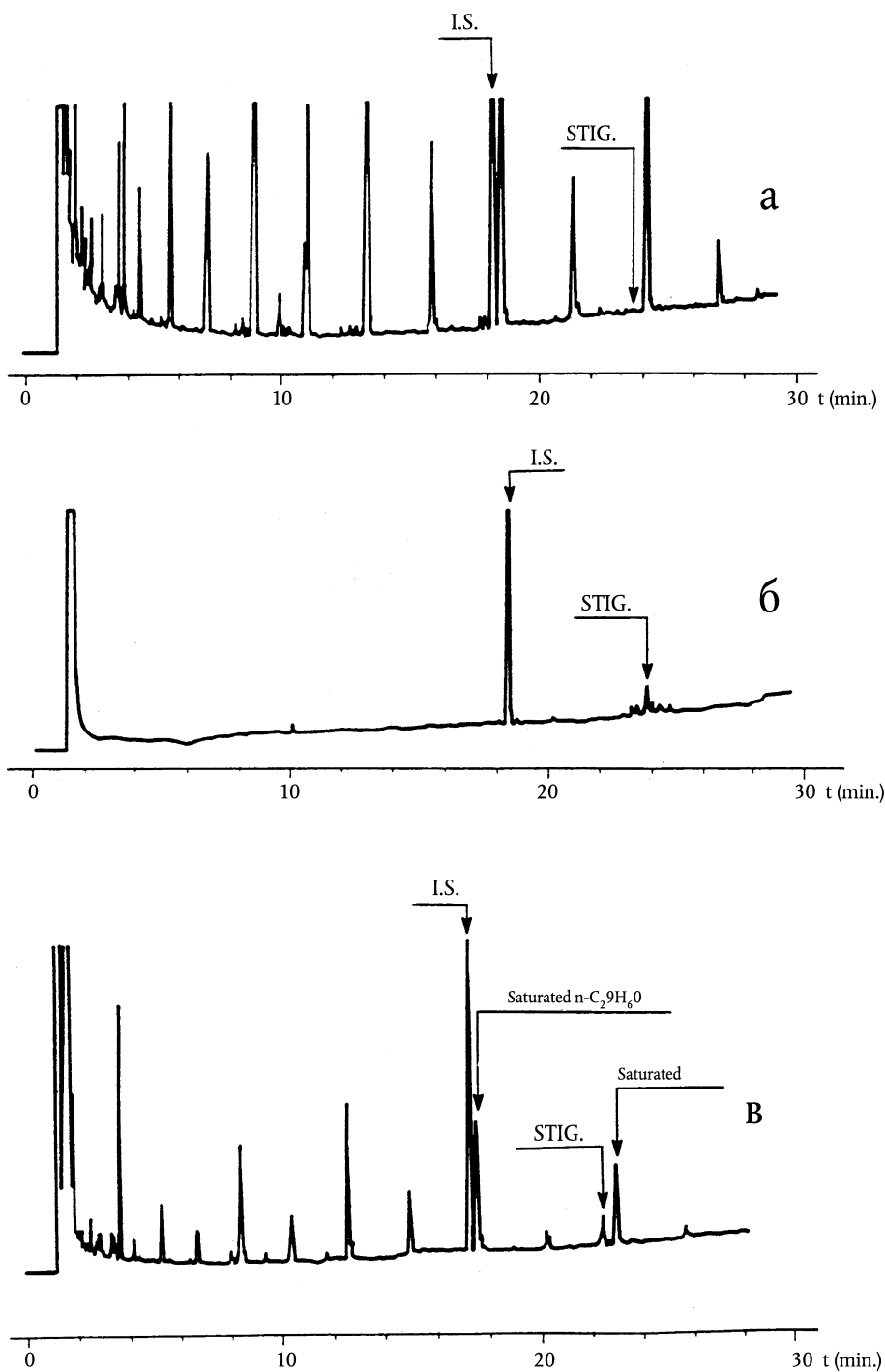
$A_c$  = зона на вътрешния стандарт (холестадиен),

$M_c$  = маса на добавения стандарт, в микрограмове,

$M_o$  = маса на взетото масло, в грамове.

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

▼ M11

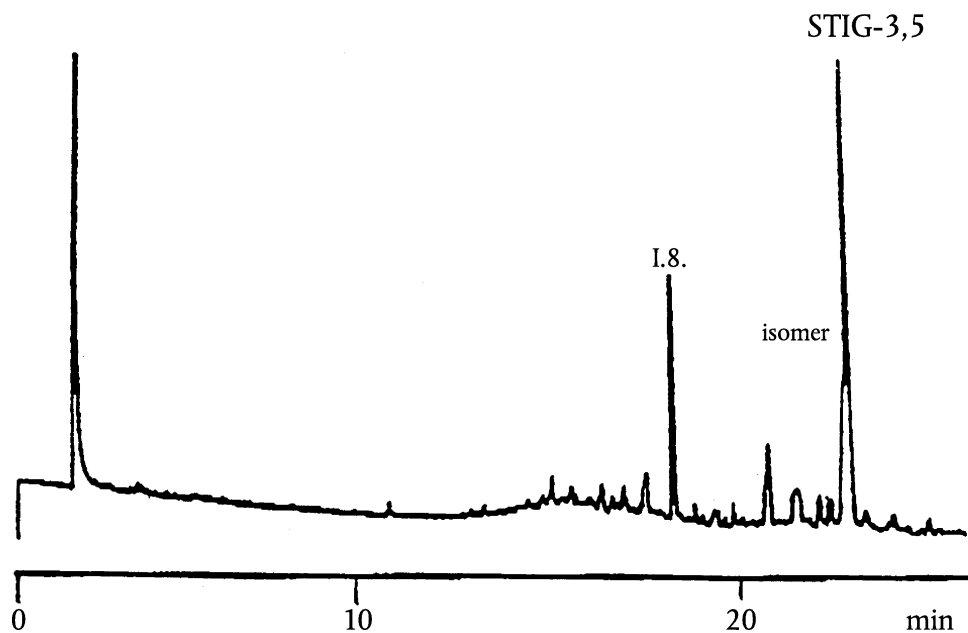


Фигура 1

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 стигма-стадиени.
- 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-стигмастадиена.

▼ **M25***ПРИЛОЖЕНИЕ XVIII***ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РАЗЛИКАТА МЕЖДУ ДЕЙСТВИТЕЛНОТО И ТЕОРЕТИЧНОТО СЪДЪРЖАНИЕ НА ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНИ С ECN 42****1. ОБХВАТ**

Определяне на абсолютната разлика между експерименталните стойности на триацилглицерините (TAG) с еквивалентно въглеродно число 42 (ECN<sub>42</sub><sup>HPLC</sup>), получени чрез определяне в маслото посредством високоефективна течна хроматография (HPLC), и теоретичната стойност на TAG с еквивалентно въглеродно число 42 (ECN 42<sup>теоретично</sup>), изчислена въз основа на състава на мастните киселини.

**2. ПРИЛОЖНО ПОЛЕ**

Стандартът се прилага за маслинови масла. Целта на метода е да се установи наличието на малки количества масла от семена (богати на линолова киселина) във всяка категория маслиново масло.

**3. ПРИНЦИП**

Съдържанието на триацилглицерини с ECN 42, определено чрез анализ с HPLC, и теоретичното съдържание на триацилглицерини с ECN 42 (изчислено въз основа на определянето на състава на мастните киселини чрез газово-течна хроматография (GLC)) до известна степен си съответстват при чистите масла. Разлика, която превишава стойностите, приети за всяка категория масло, е показател за наличието на масла от семена в това масло.

**4. МЕТОД**

Методът за изчисляване на теоретичното съдържание на триацилглицерини с ECN 42 и на разликата с данните от HPLC се състои основно в координацията на аналитичните данни, получени посредством други методи. Могат да се различат три фази: определяне на състава на мастните киселини чрез капиларна газова хроматография, изчисляване на теоретичния състав на триацилглицерините с ECN 42, определяне с HPLC на триацилглицерините с ECN 42.

**4.1. Апаратура**

- 4.1.1. Колби с обло дъно, с вместимост 250 и 500 ml.
- 4.1.2. Бехерови чаши с вместимост 100 ml.
- 4.1.3. Стъклена хроматографска колона, вътрешен диаметър 21 mm, дължина 450 mm, оборудвана с кранче и стандартен конус (женски) на върха.
- 4.1.4. Делителни фунии, с капацитет 250 ml, със стандартен конус (мъжки) в основата, която може да се прикачи към върха на колоната.
- 4.1.5. Стъклена пръчка с дължина 600 mm.
- 4.1.6. Стъклена фуния с диаметър 80 mm.
- 4.1.7. Мерителни колби с вместимост 50 ml.
- 4.1.8. Мерителни колби с вместимост 20 ml.
- 4.1.9. Ротационен изпарител.
- 4.1.10. Високоефективен течен хроматограф, позволяващ термостатичен контрол на температурата на колоната.
- 4.1.11. Инжектори за 10 µl.
- 4.1.12. Детектор: диференциален рефрактометър. Чувствителността в пълния обхват на скалата трябва да бъде поне 10<sup>-4</sup> единици от рефракционния индекс.

▼ **M25**

4.1.13 Колона: тръба от неръждаема стомана с дължина 250 mm и вътрешен диаметър 4,5 mm, пълна с частици силициев диоксид с диаметър 5 µm с 22—23% въглерод под формата на октадецил-силан.

4.1.14 Софтуер за обработка на данни.

4.1.15 Стъкленици с вместимост около 2 ml, с тефлонови прегради и капачки на винт.

#### 4.2. **Реактиви**

Реактивите трябва да са „чисти за анализ“ (ч.з.а.). Отмиващите разтворители трябва да бъдат дегазирани и могат да се рециклират няколкократно, без да това да оказва ефект върху фракциониранията.

4.2.1. Петролен етер, загрят до температура между 40 и 60 °C, за хроматография, или хексан.

4.2.2. Прямо дестилиран етилов етер без пероксид.

4.2.3. Отмиващ разтворител за пречистване на маслото чрез колонна хроматография: смес от петролен етер/етилов етер в съотношение 87/13 (v/v).

4.2.4. Силикагел с размер на частиците 70—230, от вида Merck 7734, с водно съдържание, стандартизирано на 5% (w/w).

4.2.5. Стъклена вата.

4.2.6. Ацетон за HPLC.

4.2.7. Ацетонитрил или пропионитрил за HPLC.

4.2.8. Отмиващ разтворител за HPLC: ацетонитрил + ацетон (пропорциите се нагласяят за получаването на желаното фракционирание; започва се със смес в съотношение 50:50) или пропионитрил.

4.2.9. Солубилизиращ разтворител: ацетон.

4.2.10. Стандартни триглицериди: могат да се използват или триглицериди, които се намират в търговската мрежа (трипалмитин, триолеин и т.н.), и оттам времената за задържане да се нанесат на графика, в съответствие с еквивалентното въглеродно число, или стандартни хроматограми на соево масло, на смес от соево и маслиново масло 30:70 и на чисто маслиново масло (вж. бележки 1 и 2 и фигури от 1 до 4).

4.2.11. Колона за екстракция на твърдата фаза с 1 g фаза силициев диоксид, 6 ml.

#### 4.3. **Подготовка на пробите**

Като се има предвид, че редица интерферентни субстанции могат да предизвикат фалшиви положителни резултати, пробата трябва винаги да се пречиства съгласно метода IUPAC 2.507, използван за определяне на полярните съединения в мазнините за пържене.

##### 4.3.1. *Подготовка на хроматографската колона*

Колоната (4.1.3) се напълва с около 30 ml отмиващ разтворител (4.2.3), след което в нея се вкарва известно количество стъклена вата (4.2.5) и се натиска до дъното на колоната с помощта на стъклената пръчка (4.1.5).

В бехерова чаша с вместимост 100 ml се приготвя суспензия от 25 g силикагел (4.2.4) в 80 ml отмиваща смес (4.2.3), която след това се прехвърля в колоната с помощта на стъклена фуния (4.1.6).

За да е сигурно, че целият силикагел е прехвърлен в колоната, бехеровата чаша се измива с отмиващата смес, като отмиващата течност също се прехвърля в колоната.

Кранчето се отваря и разтворителят се оставя да изтече от колоната, докато нивото му достигне около 1 cm над силикагела.



▼ **M25**4.3.2 *Колонна хроматография*

В мерителна колба с вместимост 50 ml (4.1.7) се претегля, с точност до 0,001 g,  $2,5 \pm 0,1$  g предварително филтрирано, хомогенизирано и, ако е необходимо, дехидратирано масло.

То се разтваря в около 20 ml отмиващ разтворител (4.2.3.). Ако е необходимо, леко се загрява, за да се улесни разтварянето. Охлажда се до стайна температура и се допълва с отмиващ разтворител.

С помощта на мерителна пипета се вкарват 20 ml от разтвора в колоната, подготвена съгласно точка 4.3.1, кранчето се отваря и разтворителят се оставя да изтече до нивото на слоя от силикагел.

След това се измива със 150 ml отмиващ разтворител (4.2.3), като дебитът на разтворителя се регулира на около 2 ml в минута (така че 150 ml преминават през колоната за около 60—70 минути).

Отмивката се събира в колба с обло дъно с вместимост 250 ml (4.1.1), предварително тарирана в пещ и точно претеглена. Разтворителят се отстранява под намалено налягане в ротационен изпарител (4.1.9) и се претегля остатъкът, който ще се използва за приготвяне на разтвора за HPLC анализ и за приготвянето на метилови естери.

След преминаване през колоната пробата трябва да се събере поне на 90% за категориите необработено маслиново масло „extra virgin“, необработено маслиново масло „virgin“, обикновено маслиново масло, рафинирано маслиново масло и маслиново масло, а за маслиновото масло за осветление и маслата от маслиново кюспе — поне на 80%.

4.3.3 *Пречистване чрез екстракция на твърдата фаза (SPE)*

Колоната за SPE, напълнена със силициев диоксид, се активира чрез пропускането на 6 ml хексан (4.2.3) под вакуум, като се избягва изсъхването.

В стъкления с вместимост 2 ml (4.1.15) се претеглят 0,12 g с точност до 0,001 g и се разтварят в 0,5 ml хексан (4.2.3).

Колоната за SPE се напълва с разтвора и се отмива с 10 ml смес от хексан и диетилов етер (87:13 v/v) (4.2.3) във вакуум.

Събраната част се изпарява до изсъхване в ротационен изпарител (4.1.9) под намалено налягане и при стайна температура. Остатъкът се разтваря в 2 ml ацетон (4.2.6) за анализ на триацилглицерините (TAG).

4.4. **HPLC анализ**4.4.1 *Подготовка на пробите за хроматографски анализ*

Приготвя се 5% разтвор от пробата за анализ, като се претеглят  $0,5 \pm 0,001$  g от пробата в градуирана колба с вместимост 10 ml и се допълват до 10 ml със солубилизиращия разтворител (4.2.9.).

4.4.2 *Процедура*

Включва се хроматографската система. Изпомпва се отмиващият разтворител (4.2.8) с дебит 1,5 ml/min, за да се прочисти цялата система. Изчаква се до получаването на стабилна основна линия.

Инжектират се 10  $\mu$ l от пробата, приготвена в съответствие с точка 4.3.

4.4.3 *Изчисляване и изразяване на резултатите*

Използва се методът за нормализация на лицата на пиковите, т.е. приема се, че сумата на лицата на пиковите, съответстващи на TAG от ECN 42 до ECN 52, се равнява на 100%.

Относителният процентен дял на всеки триглицерид се изчислява по формулата:

% на триглицерида = лицето на пика  $\times$  100 / сумата от лицата на пиковите.

Резултатите трябва да се представят поне до два знака след десетичната запетая.

Вж. бележки от 1 до 4.

▼ **M25**4.5. **Изчисляване на състава на триацилглицерините (% мол.) въз основа на данните за състава на мастните киселини (% от лицето)**4.5.1 *Определяне на състава на мастните киселини*

Съставът на мастните киселини се определя по ISO 5508 с помощта на капилярна колона. Метиловите естери се приготвят съгласно COI/T.20/Док. № 24.

4.5.2. *Мастни киселини, които участват в изчисленията*

Глицеридите се групират съгласно еквивалентното въглеродно число (ECN), като се вземат предвид следните съответствия между ECN и мастните киселини. Разглеждат се единствено тези мастни киселини, които имат 16 и 18 въглеродни атома, тъй като само те са от значение за маслиновото масло. Мастните киселини трябва да са нормализирани на 100%.

Мастна киселина (МК)	Съкращение	Молекулна маса (MW)	ECN
Палмитинова киселина	P	256,4	16
Палмитолеинова киселина	Po	254,4	14
Стеаринова киселина	S	284,5	18
Олеинова киселина	O	282,5	16
Линолова киселина	L	280,4	14
Линоленова киселина	Ln	278,4	12

4.5.3 *Преобразуване в молове на % от лицето за всички мастни киселини (1)*

$$\text{молове P} = \frac{\% \text{ от лицето на P}}{\text{MW P}} \quad \text{молове S} = \frac{\% \text{ от лицето на S}}{\text{MW S}} \quad \text{молове Po} = \frac{\% \text{ от лицето на Po}}{\text{MW Po}}$$

$$\text{молове O} = \frac{\% \text{ от лицето на O}}{\text{MW O}} \quad \text{молове L} = \frac{\% \text{ от лицето на L}}{\text{MW L}} \quad \text{молове Ln} = \frac{\% \text{ от лицето на Ln}}{\text{MW Ln}}$$

4.5.4 *Нормализиране на моловете на мастните киселини на 100% (2)*

$$\% \text{ мол. P (1,2,3)} = \frac{\text{молове P} * 100}{\text{молове (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ мол. S (1,2,3)} = \frac{\text{молове S} * 100}{\text{молове (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ мол. Po (1,2,3)} = \frac{\text{молове Po} * 100}{\text{молове (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ мол. O (1,2,3)} = \frac{\text{молове O} * 100}{\text{молове (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ мол. L (1,2,3)} = \frac{\text{молове L} * 100}{\text{молове (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ мол. Ln (1,2,3)} = \frac{\text{молове Ln} * 100}{\text{молове (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

Резултатът показва процентното съдържание на всяка мастна киселина, изразено в % моларни, във всички (1,2,3-) позиции на TAG.

След това се изчисляват сумите на наситените мастни киселини P и S (SFA) и ненаситените мастни киселини Po, O, L и Ln (UFA):

$$\% \text{ мол. SFA} = \% \text{ мол. P} + \% \text{ мол. S}$$

$$\% \text{ мол. UFA} = 100 - \% \text{ мол. SFA}$$

▼ **M25**4.5.5 *Изчисляване на състава на мастните киселини в позиции 2 и 1, 3 на TAG*

Мастните киселини се разпределят на три групи по следния начин: една група за позиция 2 и две идентични групи за позиции 1 и 3, с различни коефициенти за наситените (P и S) и ненаситените киселини (Po, O, L и Ln).

## 4.5.5.1 Наситени мастни киселини в позиция 2 [P(2) и S(2)]

$$\% \text{ мол. P(2)} = \% \text{ мол. P(1,2,3)} * 0,06$$

$$\% \text{ мол. S(2)} = \% \text{ мол. S(1,2,3)} * 0,06$$

## 4.5.5.2 Ненаситени мастни киселини в позиция 2 [Po(2), O(2), L(2) и Ln(2)] (5):

$$\% \text{ мол. Po(2)} = \frac{\% \text{ мол. Po(1,2,3)}}{\% \text{ мол. UFA}} * (100 - \% \text{ мол. P(2)} - \% \text{ мол. S(2)})$$

$$\% \text{ мол. O(2)} = \frac{\% \text{ мол. O(1,2,3)}}{\% \text{ мол. UFA}} * (100 - \% \text{ мол. P(2)} - \% \text{ мол. S(2)})$$

$$\% \text{ мол. L(2)} = \frac{\% \text{ мол. L(1,2,3)}}{\% \text{ мол. UFA}} * (100 - \% \text{ мол. P(2)} - \% \text{ мол. S(2)})$$

$$\% \text{ мол. Ln(2)} = \frac{\% \text{ мол. Ln(1,2,3)}}{\% \text{ мол. UFA}} * (100 - \% \text{ мол. P(2)} - \% \text{ мол. S(2)})$$

4.5.5.3 *Мастни киселини в позиции 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) и Ln(1,3)] (6):*

$$\% \text{ мол. P(1,3)} = \frac{\% \text{ мол. P(1,2,3)} - \% \text{ мол. P(2)}}{2} + \% \text{ мол. P(1,2,3)}$$

$$\% \text{ мол. S(1,3)} = \frac{\% \text{ мол. S(1,2,3)} - \% \text{ мол. S(2)}}{2} + \% \text{ мол. S(1,2,3)}$$

$$\% \text{ мол. Po(1,3)} = \frac{\% \text{ мол. Po(1,2,3)} - \% \text{ мол. Po(2)}}{2} + \% \text{ мол. Po(1,2,3)}$$

$$\% \text{ мол. O(1,3)} = \frac{\% \text{ мол. O(1,2,3)} - \% \text{ мол. O(2)}}{2} + \% \text{ мол. O(1,2,3)}$$

$$\% \text{ мол. L(1,3)} = \frac{\% \text{ мол. L(1,2,3)} - \% \text{ мол. L(2)}}{2} + \% \text{ мол. L(1,2,3)}$$

$$\% \text{ мол. Ln(1,3)} = \frac{\% \text{ мол. Ln(1,2,3)} - \% \text{ мол. Ln(2)}}{2} + \% \text{ мол. Ln(1,2,3)}$$

4.5.6 *Изчисляване на триацилглицерините*

## 4.5.6.1 TAG с една мастна киселина (AAA, тук LLL, PoPoPo) (7)

$$\% \text{ мол. AAA} = \frac{\% \text{ мол. A(1,3)} * \% \text{ мол. A(2)} * \% \text{ мол. A(1,3)}}{10\,000}$$

## 4.5.6.2 TAG с две мастни киселини (AAB, тук PoPoL, PoLL) (8)

$$\% \text{ мол. AAB} = \frac{\% \text{ мол. A(1,3)} * \% \text{ мол. A(2)} * \% \text{ мол. B(1,3)} * 2}{10\,000}$$

$$\% \text{ мол. ABA} = \frac{\% \text{ мол. A(1,3)} * \% \text{ мол. B(2)} * \% \text{ мол. A(1,3)}}{10\,000}$$

▼ **M25**

4.5.6.3 TAG с три различни мастни киселини (ABC, тук OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

$$\% \text{ мол. ABC} = \frac{\% \text{ мол. A(1,3)} * \% \text{ мол. B(2)} * \% \text{ мол. C(1,3)} * 2}{10\,000}$$

$$\% \text{ мол. BCA} = \frac{\% \text{ мол. B(1,3)} * \% \text{ мол. C(2)} * \% \text{ мол. A(1,3)} * 2}{10\,000}$$

$$\% \text{ мол. CAB} = \frac{\% \text{ мол. C(1,3)} * \% \text{ мол. A(2)} * \% \text{ мол. B(1,3)} * 2}{10\,000}$$

4.5.6.4 Триацилглицерини с ECN42

Триацилглицерините с ECN42 се изчисляват съгласно уравненията 7, 8 и 9, след което се дават по реда на очакваното отмиване в HPLC (обикновено само три пика).

LLL

PoLL и позиционния изомер LPoL

OLLn и позиционните изомери OLnL и LnOL

PoPoL и позиционния изомер PoLPo

PoOLn и позиционните изомери OPoLn и OLnPo

PLLn и позиционните изомери LLnP и LnPL

PoPoPo

SLnLn и позиционния изомер LnSLn

PoPoln и позиционните изомери PLnPo и PoPLn

Триацилглицерините с ECN42 се получават от сумата на деветте триацилглицерина, включително позиционните им изомери. Резултатите трябва да се представят поне до два знака след десетичната запетая.

## 5. ОЦЕНКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Сравняват се изчисленото теоретично съдържание и съдържанието, определено чрез HPLC анализ. Ако разликата в абсолютната стойност на данните от HPLC минус теоретичните данни е по-голяма от стойностите, посочени в стандарта за съответната категория масло, то пробата съдържа масло от семена.

Резултатите се представят до два знака след десетичната запетая.

## 6. ПРИМЕР (НОМЕРАЦИЯТА ОТГОВАРЯ НА СЪОТВЕТНИТЕ РАЗДЕЛИ В ТЕКСТА НА МЕТОДА)

— 4.5.1. *Изчисляване на мастните киселини в % моларни въз основа на данните от GLC (нормализиран % от лицето)*

Чрез GLC се получават следните данни за състава на мастните киселини:

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

▼ **M25**

- 4.5.3 *Преобразуване, в молове, на % от лицето за всички мастни киселини (вж. формула (1))*

$$\text{молове P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ мола P}$$

$$\text{молове S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ мола S}$$

$$\text{молове Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ мола Po}$$

$$\text{молове O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ мола O}$$

$$\text{молове L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ мола L}$$

$$\text{молове Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ мола Ln}$$

$$\text{Общо} = 0,35821 \text{ мола TAG}$$

- 4.5.4 *Нормализиране на моловете на мастните киселини на 100% (вж. формула (2))*

$$\% \text{ мол. P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ мола P} * 100}{0,35821 \text{ мола}} = 10,887 \%$$

$$\% \text{ мол. S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ мола S} * 100}{0,35821 \text{ мола}} = 2,942 \%$$

$$\% \text{ мол. Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ мола Po} * 100}{0,35821 \text{ мола}} = 1,097 \%$$

$$\% \text{ мол. O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ мола O} * 100}{0,35821 \text{ мола}} = 74,116 \%$$

$$\% \text{ мол. L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ мола L} * 100}{0,35821 \text{ мола}} = 9,955 \%$$

$$\% \text{ мол. Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ мола Ln} * 100}{0,35821 \text{ мола}} = 1,002 \%$$

$$\text{Общо \% моларни} = 100\%$$

Сума на наситените и ненаситените мастни киселини в позиции 1, 2 и 3 на TAG (вж. формула (3)):

$$\% \text{ мол. SFA} = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\% \text{ мол. UFA} = 100,000 \% - 13,829 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

- 4.5.5 *Изчисляване на състава на мастните киселини в позиции 2 и 1,3 на TAG*

- 4.5.5.1 *Наситени мастни киселини в позиция 2 [P(2) и S(2)] (вж. формула (4))*

$$\% \text{ мол. P(2)} = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \% \text{ мол.}$$

$$\% \text{ мол. S(2)} = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \% \text{ мол.}$$

- 4.5.5.2 *Ненаситени мастни киселини в позиция 2 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) и Ln(1,3)] (вж. формула (5))*

$$\% \text{ мол. Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \% \text{ мол.}$$

$$\% \text{ мол. O(2)} = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \% \text{ мол.}$$

$$\% \text{ мол. L(2)} = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \% \text{ мол.}$$

$$\% \text{ мол. Ln(2)} = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \% \text{ мол.}$$

▼ **M25**

- 4.5.5.3 Мастни киселини в позиции 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) и Ln(1,3)] (вж. формула (6))

$$\% \text{ мол. P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \% \text{ мол. \%}$$

$$\% \text{ мол. S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \% \text{ мол.}$$

$$\% \text{ мол. Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \% \text{ мол.}$$

$$\% \text{ мол. O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \% \text{ мол.}$$

$$\% \text{ мол. L(1,3)} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \% \text{ мол.}$$

$$\% \text{ мол. Ln(1,3)} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \% \text{ мол.}$$

- 4.5.6. Изчисляване на триацилглицерините

От изчисления състав на мастни киселини в позиции sn-2 и sn-1,3 (вж. по-горе):

МК в	Поз. 1,3	Поз. 2
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Сума	100,0 %	100,0 %

се изчисляват следните триацилглицерини:

LLL

PoPoPo

PoLL с 1 позиционен изомер

SLnLn с 1 позиционен изомер

PoPoL с 1 позиционен изомер

PPoLn с 2 позиционни изомера

OLLn с 2 позиционни изомера

PLLn с 2 позиционни изомера

PoOLn с 2 позиционни изомера

- 4.5.6.1 TAG с една мастна киселина (LLL, PoPoPo) (вж. формула (7))

$$\% \text{ мол. LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\,000} = \mathbf{0,09706 \text{ мол. LLL}}$$

$$\% \text{ мол. PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\,000} = \mathbf{0,00013 \text{ мол. PoPoPo}}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2 TAG с две мастни киселини (PoLL, SLnLn, PoPoL)  
(вж. формула (8))

$$\% \text{ мол. PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,02141$$

$$\% \text{ мол. LPoL} = \frac{9,204 \% * 1,262 \% * 9,204 \%}{10\,000} = 0,01069$$

**0,03210 мол. PoLL**

$$\% \text{ мол. SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,325 \% * 1,153 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00092$$

$$\% \text{ мол. LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\,000} = 0,00002$$

**0,00094 мол. SLnLn**

$$\% \text{ мол. PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,00236$$

$$\% \text{ мол. PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 1,015 \%}{10\,000} = 0,00118$$

**0,00354 мол. PoPoL**

— 4.5.6.3 TAG с три различни мастни киселини (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) Вж. формула (9)

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

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

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

**0,00761 мол. PPOln**

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

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

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

**0,43655 мол. OLLn**

$$\% \text{ мол. PLLn} = \frac{16,004 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,03399$$

$$\% \text{ мол. LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,00111$$

$$\% \text{ мол. LLnP} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\,000} = 0,03397$$

**0,06907 мол. PLLn**

▼ M25

$$\% \text{ мол. PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,296 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,01605$$

$$\% \text{ мол. LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,262 \% * 68,526 \% * 2}{10\,000} = 0,01603$$

$$\% \text{ мол. OLnPo} = \frac{68,526 \% * 1,153 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,01604$$

**0,04812 мол. PoOLn**

**ECN42 = 0,69512 мол. TAG**

*Бележка 1:* Редът на отмиване може да се определи чрез изчисляването на еквивалентните въглеродни числа, често определяни като зависимостта  $ECN = CN - 2n$ , където  $CN$  е въглеродното число, а „ $n$ “ е броят на двойните връзки; той може да се изчисли по-прецизно, като се вземе предвид произходът на двойната връзка. Ако  $n_o$ ,  $n_l$  и  $n_{ln}$  представляват броя на двойните връзки, характерни съответно за олеиновата, линоловата и линоленовата киселина, еквивалентното въглеродно число може да се изчисли чрез зависимостта във формулата:

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

където коефициентите  $d_o$ ,  $d_l$  и  $d_{ln}$  могат да се изчислят чрез референтните триглицериди. При условията, посочени в настоящия метод, получената зависимост ще е близка до:

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

*Бележка 2:* При няколко стандартни триглицериди е възможно да се изчисли и равенството по отношение на триолеина:

$$\alpha = RT^1 / RT \text{ триолеин}$$

като се използва намаленото време за задържане  $RT^1 = RT - RT$  разтворител.

Графиката на  $\log \alpha$  при основа  $f$  (брой на двойните връзки) позволява определянето на времената за задържане за всички триглицериди на мастните киселини, съдържащи се в референтните триглицериди — вж. фигура 1.

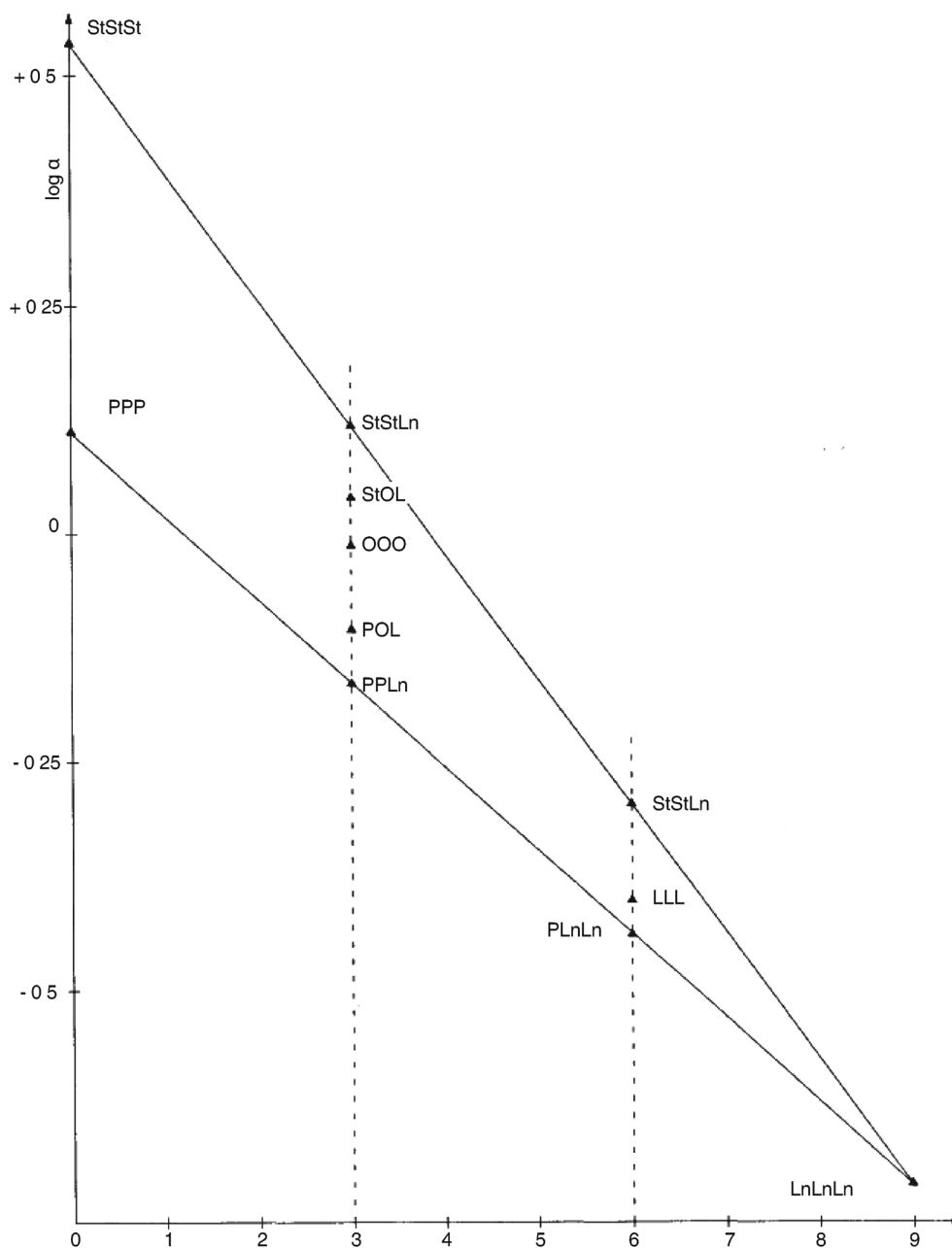
*Бележка 3:* Ефикасността на колоната трябва да позволява ясното отделяне на пика на трилинолеина от пиковете на триглицеридите с близко  $RT$ . Отмиването се осъществява до пика  $ECN 52$ .

*Бележка 4:* Точността на измерване на лицата на всички пикове, които са от значение за настоящото определяне, е спазена, ако вторият пик, съответстващ на  $ECN 50$ , е равен на 50% от пълния обхват на скалата на записващото устройство.



## ▼ M25

Фигура 1

Графика на  $\log a$  към  $f$  (брой на двойните връзки)

Брой на двойните връзки

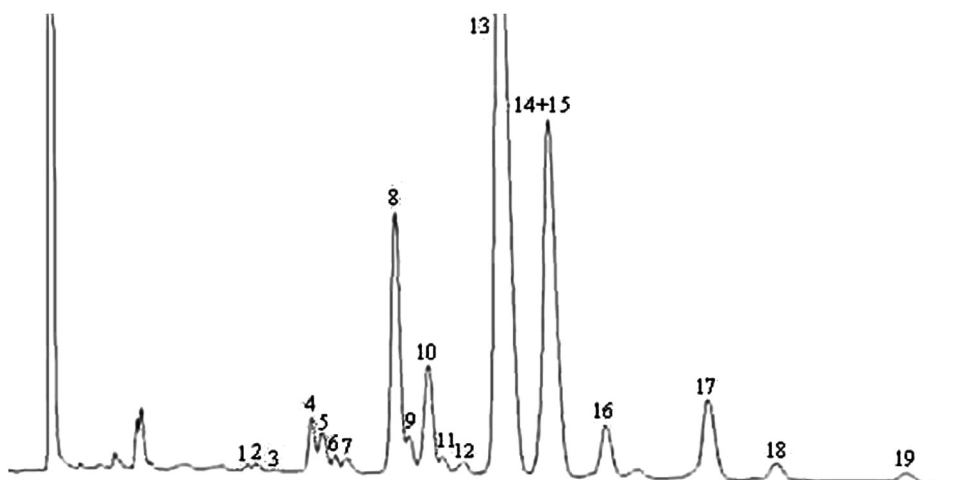
La: лауринова киселина; Му: миристинова киселина; P: палмитинова киселина; S: стеаринова киселина; O: олеинова киселина; L: линолова киселина; Lп: линоленова киселина

## ▼ M25

Фигура 2

Маслиново масло с ниско съдържание на линолова киселина

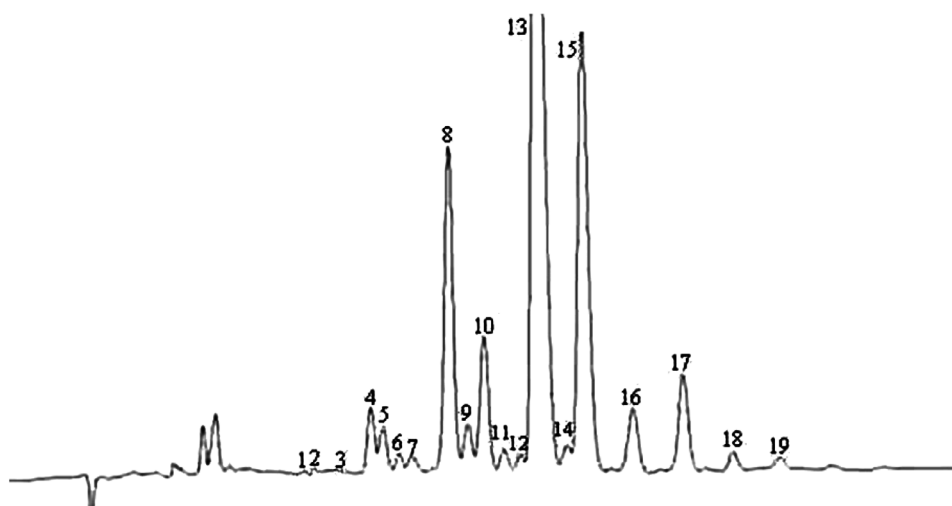
а



С разтворител: ацетон/ацетонитрил.

ПРОФИЛ а: Основни компоненти на хроматографските пикове: **ECN42**: (1) LLL+PoLL; (2) OLLn+PoOLn; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL+PoOL; (5) OOLn +PLL; (6) POLn+PPoPo; (7) OOL+PoOO; **ECN46**: (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO+PoPP; (14+15) SOL+POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS+SLS.

б



С разтворител: пропионитрил

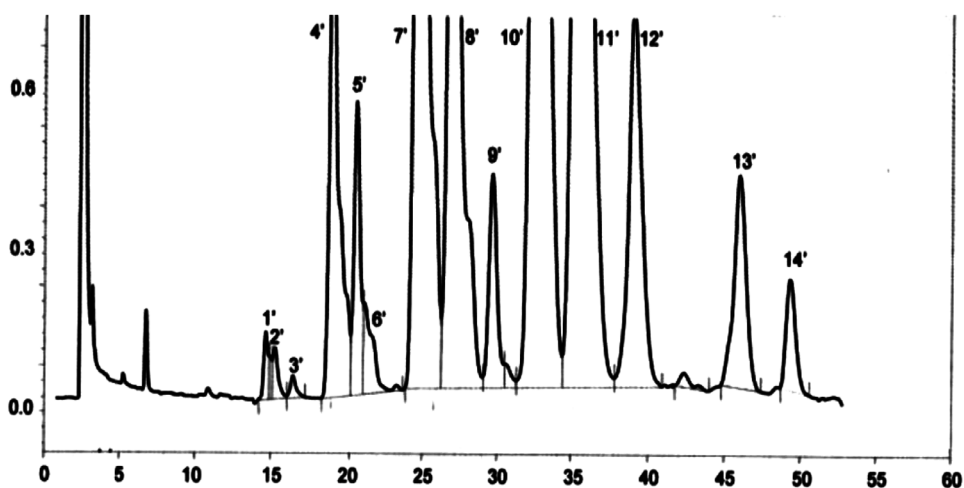
ПРОФИЛ б: Основни компоненти на хроматографските пикове: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn+PoOL; (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; **ECN46**: (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS+SLS

## ▼ M25

Figure 3

Маслиново масло с високо съдържание на линолова киселина

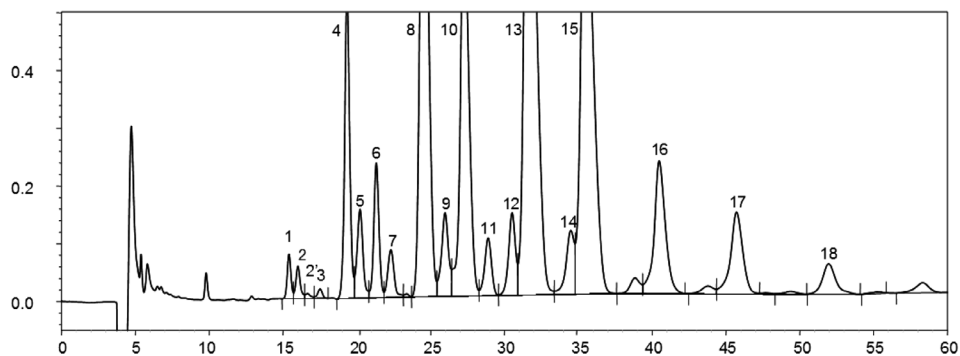
а



При разтворител: ацетон/ацетонитрил (50:50).

Профил а: Основни компоненти на хроматографските пикове: ECN42: (1') LLL+PoLL; (2') OLLn+PoOLn; (3') PLLn; ECN44: (4') OLL+PoOL; (5') OOLn +PLL; (6') POLn+PPoPo; ECN46: (7') OOL+PoOO; (8') PLO+SLL+ PoOP; (9') PLP+PoPP; ECN48: (10') OOO; (11') POO+SLL+PPoO; (12') POP+PLS; ECN50: (13') SOO; (14') POS+SLS

б



С разтворител: пропионитрил.

Профил б: Основни компоненти на хроматографските пикове: ECN42: (1) LLL; (2+2') OLLn+PoLL; (3) PLLn; ECN44: (4) OLL; (5) OOLn+PoOL; (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; ECN46: (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; ECN48: (12) PLP; (13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; ECN50: (17) SOO; (18) POS+SLS; ECN52: (19) AOO.

**▼ M19***ANNEX XIX***▼ M28****ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА АЛИФАТНИ И ТРИТЕРПЕНОВИ АЛКОХОЛИ ЧРЕЗ КАПИЛЯРНА ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ**

## 1. ПРЕДМЕТ

В настоящото приложение се описва метод за определяне на съдържанието на алифатни и тритерпенови алкохоли в масла и мазнини.

**▼ M19**

## 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  $\pm 1$  °C.
  - 3.10.2. A temperature-adjustable injection unit with a persilanised glass vapourising 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.

**▼ M28**

- 4.11. Референтен разтвор за тънкослойна хроматография: смес от 0,5 % алкохоли от C<sub>20</sub> до C<sub>28</sub> в хлороформ, или фракция от алкохоли, получена според указанията в точка 5.2 от неосапуняемите съставки на маслиново масло от остатъчен материал.

**▼ M19**

- 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 C<sub>20</sub> to C<sub>28</sub>. 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-icosanol 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-icosanol solution in chloroform (4.17) containing a quantity of 1-icosanol 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-icosanol 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 <sup>(1)</sup>.

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.

<sup>(1)</sup> 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.

**▼ M28**

- 5.2.5. Плаката се напръсква леко и равномерно с разтвора на 2',7'-дихлорофлуоресцин когато се наблюдава под ултравиолетова светлина. Ивицата от алифатни алкохоли може да се разпознае чрез сравняване с петното, получено от референтния разтвор: границите на ивицата се отбелязват с черен молив, като се очертават заедно ивицата от алифатни алкохоли и ивицата непосредствено над нея, която е ивицата от терпеновите алкохоли (Бележка 4).

*Бележка 4:* Изискването за съвместното групиране на ивицата от алифатни алкохоли и ивицата от терпенови алкохоли се определя от възможната миграция на някои алифатни алкохоли към ивицата на тритерпеновите алкохоли. Пример на разделяне посредством газова хроматография е даден на фигура 1 от допълнението.

- 5.2.6. Силикагелът в очертаните участъци се изтърква с помощта на метална шпатула. Отделеният стрит на фин прах материал от силикагел се поставя във фунията за филтруване (точка 3.7). Добавят се 10 ml горещ хлороформ, разбърква се добре с металната шпатула и се филтрува под вакуум, като филтратът се събира в конусовидната колба (точка 3.8.), свързана с фунията за филтруване.

Силикагелът от фунията се промива три пъти с етилов етер (с около 10 ml всеки път), като филтратът се събира в същата колба, свързана с фунията. Филтратът се изпарява до обем 4—5 ml и остатъчният разтвор се прехвърля в епруветка с вместимост 10 ml (точка 3.9.), която е била претеглена предварително; изпарява се до изсъхване чрез слабо подгриване под слаба струя азот; утайката се разтваря отново с няколко капки ацетон, след което отново се изпарява до изсъхване, поставя се в пещ при температура 105 °C за около 10 минути, след което се оставя да се охлади в десикатор и се претегля.

Остагъкът в епруветката се състои от алкохолната фракция.

**▼ M19****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 C<sub>26</sub> retention time shall be 18 ± 5 minutes,
- the alcohol C<sub>22</sub> 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.

**▼ M28**

5.4.4. Идентифициране на пиковете.

Идентифицирането на индивидуалните пикове се извършва съгласно времената за задържане и в сравнение със стандартната смес от триметилсилилови етери, анализирана при същите условия.

Примери на хроматограма на алкохолната фракция на рафинирано маслиново масло са показани на фигури 2 и 3 от допълнението.

**▼ M19**

5.4.5. Quantitative evaluation

5.4.5.1. The peak areas of 1-eicosanol and of the aliphatic alcohols C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub> and C<sub>28</sub> 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<sub>x</sub> = area of the alcohol peak x

A<sub>s</sub> = area of 1-eicosanol

m<sub>s</sub> = mass of 1-eicosanol in milligrams

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

6. EXPRESSION OF THE RESULTS

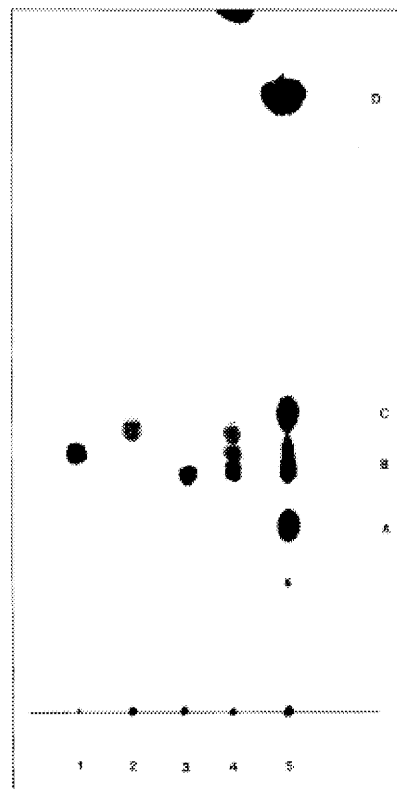
The contents of the individual aliphatic alcohols in mg/1 000 g of fatty substance and the sum of the „total aliphatic alcohols“ are reported.

▼ M28*Допълнение*

Пример на разделяне посредством тънкослойна хроматография и примери на хроматограми

*Фигура 1*

Плака за тънкослойна хроматография от неосапуняемата фракция от маслиново масло, елуирано с хексан/етилов етер (65/35)

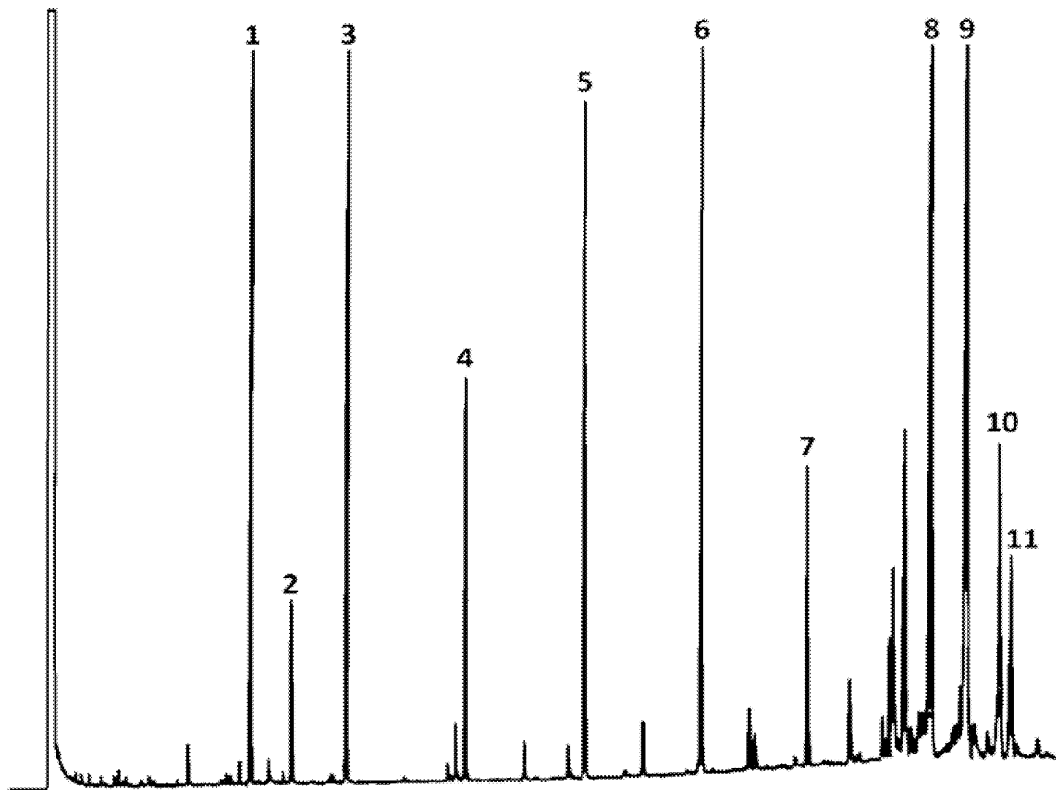


- |   |   |   |                       |
|---|---|---|-----------------------|
| 1 | Алкохол C <sub>26</sub>                   | A | Стероли               |
| 2 | Алкохол C <sub>30</sub>                   | B | Алифатни алкохоли     |
| 3 | Алкохол C <sub>20</sub>                   | C | Тритерпенови алкохоли |
| 4 | Смес алкохоли C <sub>20-22-26-30</sub>    | D | Сквален               |
| 5 | Неосапуняемо необработено маслиново масло |   |                       |

## ▼ M28

Фигура 2

Хроматограма на алкохолната фракция на рафинирано маслиново масло



1 = фитол

2 = геранилгераниол

3 = алкохол C20 (IS)

4 = алкохол C22

5 = алкохол C24

6 = алкохол C26

7 = алкохол C28

8 = циклоартенол

9 = 24-метиленициклоартенол

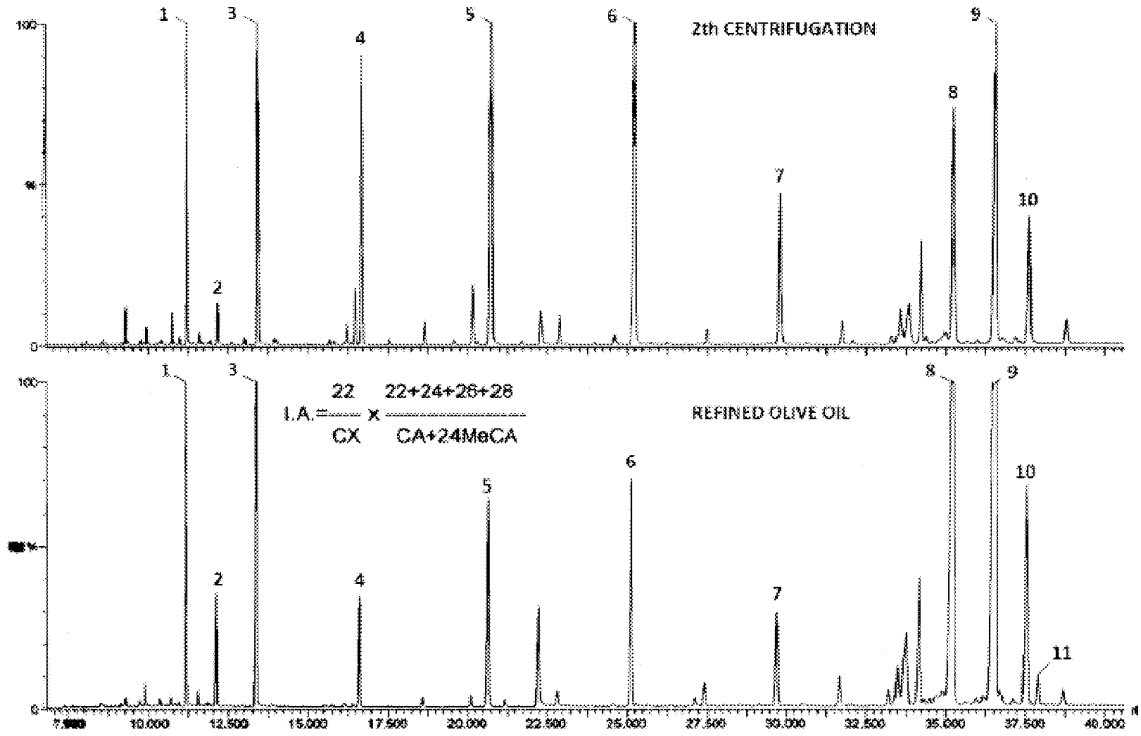
10 = цитрострадиенол

11 = циклобранол

## ▼ M28

Фигура 3

Алифатни и тритерпенови алкохоли от рафинирано маслиново масло и маслиново  
масло от второ центрофугиране



- |                          |                       |                                     |
|--------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 1 = фитол                | 5 = алкохол C24       | 9 = 24-метиленциклоартенол (24MeCA) |
| 2 = геранилгераниол (CX) | 6 = алкохол C26       | 10 = цитростадиенол                 |
| 3 = алкохол C20          | 7 = алкохол C28       | 11 = циклобранол                    |
| 4 = алкохол C22          | 8 = циклоартенол (CA) |                                     |

▼ **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, правец 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  $\mu\text{m}$ . 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 сушилнята 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 прекиси. 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, миритилов 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, сгъстен 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, сгъстен 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 угаи 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 хептадеканат 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).

Остава се разтворителят да стигне до 1 mm над горното ниво на абсорбента. Перколят се допълнително n-хексан/етилов етер (99:1) и се събират 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. Нагрява 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 б:* 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  $18 \pm 3$  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 пиковете се определят по такъв начин, че да се извърши правилна оценка на съответните площи на пиковете.

### 5.3. Извършване на анализа

Вземат се 10  $\mu$ l от разтвора с помощта на микроспринцовка от 10  $\mu$ l 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 пиковете

Пиковете 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 пиковете, съответстващи на вътрешния стандарт от лаурилов арахидат и алифатните естери от C<sub>40</sub> до C<sub>46</sub>.

Определя се общото съдържание на въсьци, като се добавя всеки отделен въськ в mg/kg мастно 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 мастните киселини  $C_{16}$  и  $C_{18}$  и на етиловите естери на мастните киселини  $C_{16}$  и  $C_{18}$ .

Определя се общото съдържание на всеки алкилов естер в mg/kg мастно 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 осъци от  $C_{40}$  до  $C_{46}$  (*забележка 7*) в милиграми на килограм мастно 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.

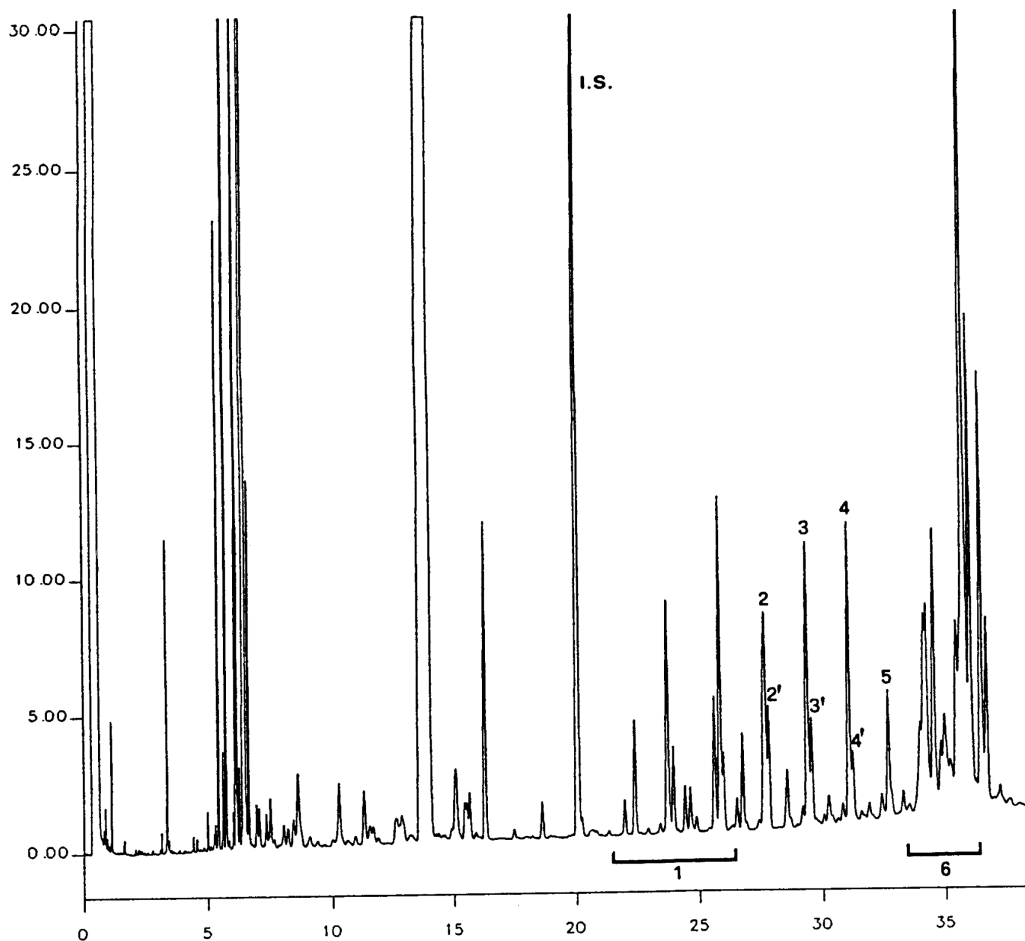
*Забележка 7:* Съставките, които трябва да бъдат определени количествено, съответстват на пиковите с четен брой въглеродни атоми сред естерите  $C_{40}$  до  $C_{46}$ , в съответствие с примерната хроматограма на осъците в маслиновото масло, показана на приложената фигура. За целите на разпознаването, ако естерът  $C_{46}$  е разделен, се препоръчва да се анализира фракцията на осъците 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 <sup>(1)</sup>



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 C<sub>40</sub>

3+3' — естери C<sub>42</sub>

4+4' — естери C<sub>44</sub>

5 — естери C<sub>46</sub>

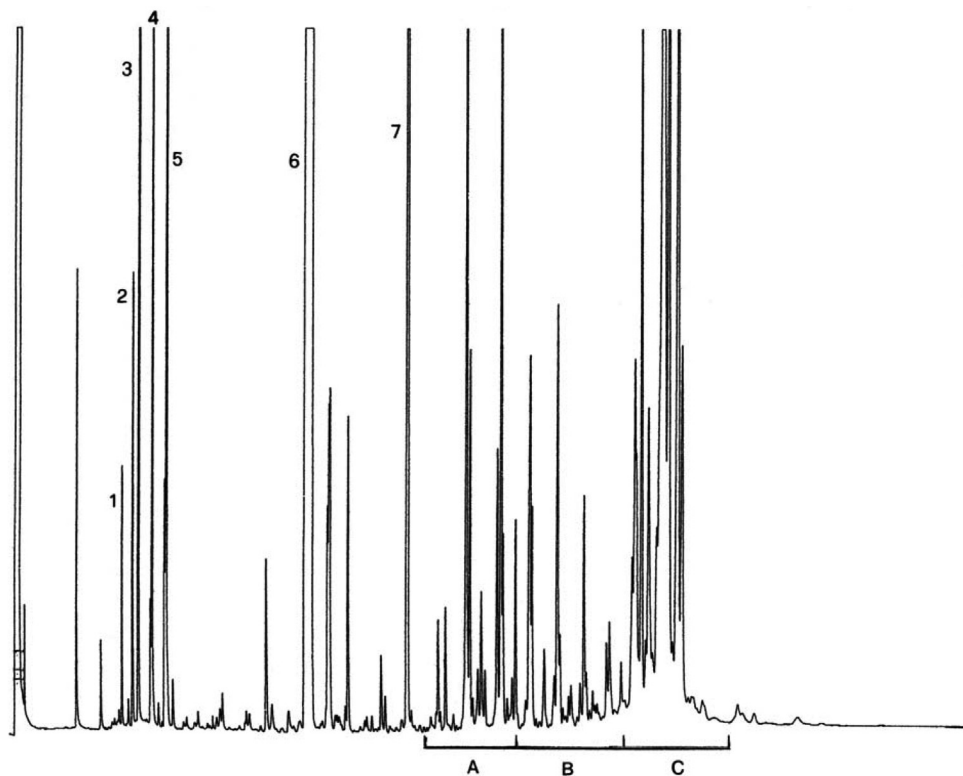
6 — стеролови естери и тритерпенови алкохоли

<sup>(1)</sup> 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



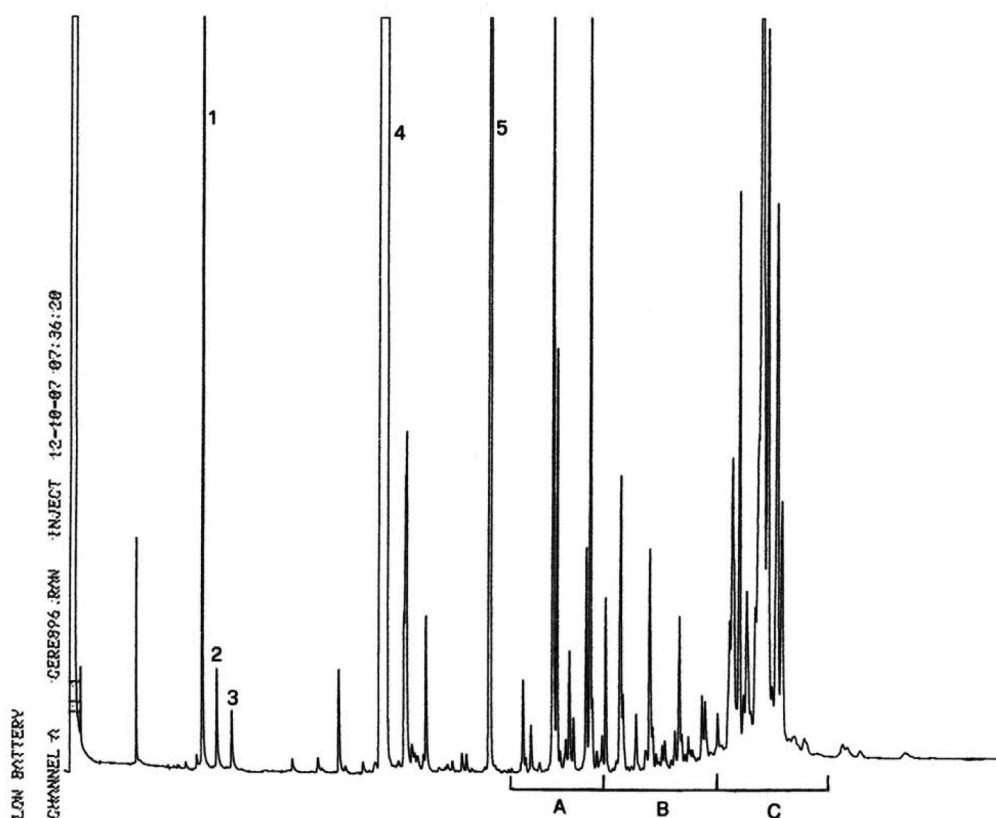
Условни знаци:

- 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

Метилви естери, етилови естери и вощи в необработено маслиново масло с екстра качество



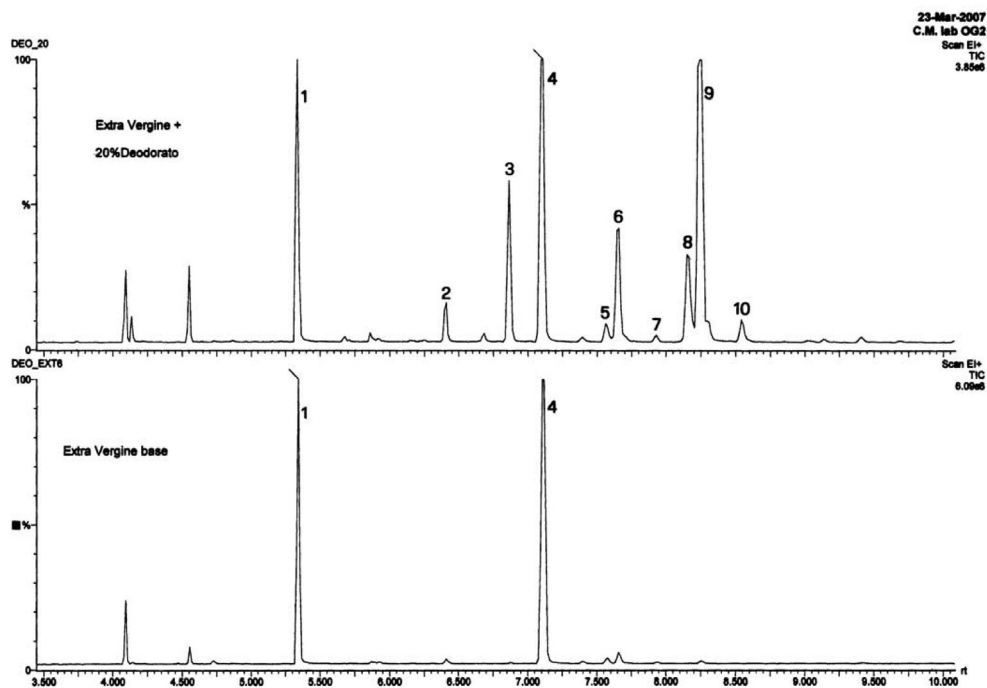
Условни знаци:

- 1 – метилов хептадеcanoат I.S.
- 2 – метил C<sub>18</sub>
- 3 – етил C<sub>18</sub>
- 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 миристенат I.S.
- 2 – метилов палмитат
- 3 – етилов палмитат
- 4 – метилов хептадеканат 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  $\mu\text{l}$  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  $\text{cm/s}$  се пресмята по формулата  $L/t_M$ , където  $L$  е дължината на колоната в сантиметри, а  $t_M$  е измереното време в секунди.

**▼ M28**

---

## ПРИЛОЖЕНИЕ XXI

## Резултати от проверките за съответствие, извършени по отношение на маслиновите масла, посочени в член 8, параграф 2

				Етикетиране						Химически параметри			Органолептични характеристики <sup>(4)</sup>			Окончателно заключение	
Проба	Категория	Държава на произход	Място на инспекцията <sup>(1)</sup>	Официално наименование	Наименование за произход	Условия на съхранение	Грешна информация	Четливост	С/НС <sup>(2)</sup>	Параметри извън граничните стойности ДА/НЕ	Ако отговорът е „да“, моля посочете кой/кои от тях <sup>(2)</sup>	С/НС <sup>(2)</sup>	Медиана на недостатъците	Медиана на признака „с вкус на плодове“	С/НС <sup>(2)</sup>	Необходими мерки	Санкция

<sup>(1)</sup> Вътрешният пазар (фабрика за производство на маслиново масло, бутилиращо предприятие, етап на продажба на дребно), износ, внос.

<sup>(2)</sup> Всяка от характеристиките на маслиновото масло, посочени в приложение I, се обозначава с код.

<sup>(3)</sup> Съответства/не съответства.

<sup>(4)</sup> Не се изисква за маслиновото масло и за маслото от маслинено кюспе.