

31991R2568

5.9.1991

ОФИЦИАЛЕН ВЕСТНИК НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ

L 248/1

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

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската икономическа общност,

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

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

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

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

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

като има предвид, че методът за органолептичен анализ на необработеното маслиново масло virgin включва създаването на групи от подбрани дегустатори; като има предвид, че срокът,

необходим за създаването на подобна структура, трябва по тази причина да бъде определен; като има предвид, че с оглед трудностите, които някои държави-членки ще срещнат при създаването на групи от дегустатори, трябва да се даде разрешение за използването на групи в други държави-членки;

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

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

като има предвид, че е необходима отмяната на Регламент (ЕИО) № 1058/77 на Комисията <sup>(3)</sup>, последно изменен с Регламент (ЕИО) № 1858/88 <sup>(4)</sup>;

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

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

**Член 1**

1. Маслата, чиито характеристики съответстват на изложените в точки 1, 2 и 3 от приложение I към настоящия регламент, се считат за необработеното маслиново масло по смисъла на точка 1, букви а), б) и в) от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

2. Маслото, чиито характеристики съответстват на изложените в точка 4 от приложение I към настоящия регламент, се счита за необработено маслиново масло за осветление по смисъла на точка 1, буква г) от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

3. Маслото, чиито характеристики съответстват на изложените 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.

<sup>(1)</sup> ОВ 172, 30.9.1996 г., стр. 3025/66.

<sup>(2)</sup> ОВ L 353, 17.12.1990 г., стр. 23.

<sup>(3)</sup> ОВ L 128, 24.5.1977 г., стр. 6.

<sup>(4)</sup> ОВ L 166, 1.7.1988 г., стр. 10.

4. Маслото, чиито характеристики съответстват на изложените в точка 4 от приложение I към настоящия регламент, се счита за чисто маслиново масло по смисъла на точка 3 от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

5. Маслото, чиито характеристики съответстват на изложените в точка 4 от приложение I към настоящия регламент, се счита за маслиново масло от остатъчен материал по смисъла на точка 4 от приложението към Регламент № 136/66/ЕИО.

6. Маслото, чиито характеристики съответстват на изложените в точка 4 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. Маслото, чиито характеристики съответстват на изложените в точка 9 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.

#### Член 2

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

- за определяне на свободните мастни киселини, изразени като процент олеинова киселина, се използва методът, описан в приложение II,
- за определяне на пероксидното число се използва методът, описан в приложение III,
- за определяне на алифатните алкохоли се използва методът, описан в приложение IV,
- за определяне на стеролното съдържание се използва методът, описан в приложение V,
- за определяне на еритродиола и уваола се използва методът, описан в приложение VI,
- за определяне на наситените мастни киселини на позиция 2 в триглицерида се използва методът, описан в приложение VII,
- за определяне на съдържанието на тринолеин се използва методът, описан в приложение VIII,
- за спектрофотометричен анализ се използва методът, описан в приложение IX,
- за определяне състава на мастната киселина се използва методът, описан в приложение X А и X Б,
- за определяне на летливите халоген-съдържащи разтворители се използва методът, описан в приложение XI,
- за анализа на органолептичните характеристики на студено пресованото маслиново масло се използва методът, описан в приложение XII,
- за доказване наличието на протекъл процес по рафиниране се използва методът, описан в приложение XIII.

2. Анализът на органолептичните свойства се провежда от аналитик и, ако е подходящо, с помощта на специалист в съответствие с процедурата, описана в дегустаторските бележки, посочени

в приложение XII. Ако анализът покаже характеристики, различни от съдържащите се в описанието на продукта, пробата се разглежда от група дегустатори в съответствие с разпоредбите на приложение XII.

Всеки повторен анализ се провежда от групата в съответствие с посочените разпоредби.

За осигуряване наличието на органолептичните характеристики във връзка с действия, принадлежащи към режима на интервенция, групата дегустатори провежда анализа в съответствие с разпоредбите на приложение XII.

#### Член 3

До 31 октомври 1992 г. въвеждането на методите за анализ, предвидени в член 2, не е пречка държавите-членки да използват други проверени научно-валидни методи, стига на продуктите, за които се счита, че съответстват с правилата на Общността в сила по отношение на използваната методика, да се позволява свободно движение. Съответните държави-членки съобщават на Комисията другите методи, преди да ги използват.

Ако някой от останалите методи доведе до резултат, който се различава от получения по метода на Общността, определящ е резултатът, получен с помощта на метода на Общността.

#### Член 4

1. За оценка на органолептичните свойства държавите-членки създават групи от обучени и подбрани дегустатори в съответствие с правилата, изложени в методиката по приложение XII.

2. Ако държава-членка срещне затруднения при създаването на своя територия на такава група, тя може да използва услугите на група, която работи в друга държава-членка.

#### Член 5

Допълнителни бележки 2, 3 и 4 към глава 15 от Комбинираната номенклатура се заменят от съдържащите се в приложение XIV.

#### Член 6

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

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

#### Член 7

Прилагат се разпоредбите на Общността относно наличието на нежелани вещества, различни от тези, посочени в приложение XI.

#### Член 8

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

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

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

#### Член 9

Регламент (ЕИО) № 1058/77 се отменя.

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

Съставено в Брюксел на 11 юли 1991 година.

#### 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 1 януари 1992 г., освен за действия, свързани с режима на интервенция.

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.

*За Комисията*

Ray MAC SHARRY

*Член на Комисията*

## ПРИЛОЖЕНИЯ

## Съдържание

Приложение I:	Характеристики на маслиновото масло .....	70
Приложение II:	Определяне на свободните мастни киселини.....	72
Приложение III:	Определяне на пероксидното число.....	74
Приложение IV:	Определяне на съдържанието на алифатни алкохоли чрез капилярна газова хроматография .....	76
Приложение V:	Определяне състава и съдържанието на стероли чрез капилярноколонкова газова хроматография .....	81
Приложение VI:	Определяне на съдържанието на еритродиол и уваол .....	89
Приложение VII:	Определяне на наситените мастни киселини на второ място в триглицерида .....	91
Приложение VIII:	Определяне състава на трилинолеина .....	95
Приложение IX:	Спектрофотометрично изследване в ултравиолетовия спектър .....	99
Приложение X А:	Газовохроматографски анализ на метиловите естери на мастните киселини .....	103
Приложение X Б:	Създаване на метил естери на мастни киселини .....	111
Приложение XI:	Определяне на халоген-съдържащите разтворители на маслиновото масло.....	115
Приложение XII:	Органолептична експертиза на необработено маслиново масло virgin .....	116
Приложение XIII:	Доказване на извършено рафиниране.....	142
Приложение XIV:	Допълнителни бележки 2, 3 и 4 към глава 15 на Комбинираната номенклатура ...	144
Приложение XV:	Маслено съдържание на остатъчния материал .....	147
Приложение XVI:	Определяне стойността на йодното число .....	149

ПРИЛОЖЕНИЕ I  
ХАРАКТЕРИСТИКИ НА МАСЛИНОВОТО МАСЛО

Тип	Киселинност %	Пероксидно число meq/O <sub>2</sub> /kg	Халотени- рани разтво- рители mg/kg (1)	Алифатни алкохоли mg/kg	Наситени мастини киселини на второ място на трилицерида %	Еритриодиол + Уваол %	Трипнлоленн %	Холестерол %	Брасикасте- рол %	Кампестерол %	Стигмастерол %	Бета- ситостерол % (2)	Делта-7- стигмастерол %	Общо коли- чество на стеролиде mg/kg
1. Необработено маслиново масло екстра virgin	M 1,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Камп.	m 93,0	M 0,5	m 1000
2. Необработено маслиново масло virgin	M 2,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Камп.	m 93,0	M 0,5	m 1000
3. Обикновено необработено маслиново масло virgin	M 3,3	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Камп.	m 93,0	M 0,5	m 1000
4. Необработено маслиново масло virgin за освет- ление	> 3,3	> 20	> 0,20	M 400	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 1000
5. Рафинирано маслиново масло	M 0,5	M 10	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Камп.	m 93,0	M 0,5	m 1000
6. Маслиново масло	M 1,5	M 15	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Камп.	m 93,0	M 0,5	m 1000
7. Сурово масли- ново масло от остатъчен мате- риал	m 2,0	—	—	—	M 1,8	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 2500
8. Рафинирано маслиново масло от остатъчен материал	M 0,5	M 10	M 0,20	—	M 2,0	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Камп.	m 93,0	M 0,5	m 1800
9. Маслиново масло от остатъчен мате- риал	M 1,5	M 15	M 0,20	—	M 2,0	> 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Камп.	m 93,0	M 0,5	m 1800

M = максимално, m = минимално.

(1) Общата горна граница за съединения, засечени с електронноуповителен детектор. За индивидуално засечените компоненти горната граница е 0,10 mg/kg.

(2) Делта-5-2-стигмасташенол + клеростерол + ситостерол + делта-5-авеностерол + делта-5-24-стигмасташенол.

Бележки:

Маслото следва да се отхвърли, ако някоя от неговите характеристики попада извън установените норми.

Тип	Киселинен състав							К <sub>270</sub>	К <sub>270</sub> с диалуминиев триоксид <sup>(1)</sup>	Делта К	Панелен тест
	Миристинова %	Линоленова %	Арахидонова %	Ейкозаноева %	Бехенова %	Липноперилова %	К <sub>232</sub>				
1. Необработено маслиново екстра virgin масло	М 0,1	М 0,9	М 0,7	М 0,5	М 0,3	М 0,5	М 2,40	М 0,20	М 0,10	М 0,01	≥ 6,5
2. Необработено маслиново virgin масло	М 0,1	М 0,9	М 0,7	М 0,5	М 0,3	М 0,5	М 2,50	М 0,25	М 0,10	М 0,01	≥ 5,5
3. Обикновено необработено маслиново virgin масло	М 0,1	М 0,9	М 0,7	М 0,5	М 0,3	М 0,5	М 2,50	М 0,25	М 0,10	М 0,01	≥ 3,5
4. Необработено маслиново virgin масло за осветление	М 0,1	М 0,9	М 0,7	М 0,5	М 0,3	М 0,5	М 3,70	> 0,25	М 0,11	—	≥ 3,5
5. Рафинирано маслиново масло	М 0,1	М 0,9	М 0,7	М 0,5	М 0,3	М 0,5	М 3,40	М 1,20	—	М 0,16	—
6. Маслиново масло	М 0,1	М 0,9	М 0,7	М 0,5	М 0,3	М 0,5	М 3,30	М 1,00	—	М 0,13	—
7. Сурово маслиново масло от остатъчен материал	М 0,1	М 0,9	М 0,7	М 0,5	М 0,3	М 0,5	—	—	—	—	—
8. Рафинирано маслиново масло от остатъчен материал	М 0,1	М 0,9	М 0,7	М 0,5	М 0,3	М 0,5	М 5,50	М 2,50	—	М 0,25	—
9. Маслиново масло от остатъчен материал	М 0,1	М 0,9	М 0,7	М 0,5	М 0,3	М 0,5	М 5,30	М 2,00	—	М 0,20	—

Бележки:

(<sup>1</sup>) В случай че киселинността на маслата е по-голяма от 3,3 %, ако К<sub>270</sub> е повече от 0,11 след пасиране върху диалуминиев триоксид, е необходимо да се проведе опита за рафиниране, упоменат в приложение XIII. С цел установяване на чистотата, когато К<sub>270</sub> превишава нормата за споменатата категория, киселинността се определя отново след пасиране върху диалуминиев триоксид.

## ПРИЛОЖЕНИЕ II

## ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СВОБОДНИТЕ МАСТНИ КИСЕЛИНИ

## 1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КИСЕЛИННОСТТА

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

## 1.1. Принцип

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

## 1.2. Реактиви

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

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

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

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

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

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

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

*Бележка:* Стабилизираният разтвор на калиев хидроксид може да се приготви по следния начин. Довеждат се до кипене 1000 ml етанол с добавка на 8 g калиев хидроксид и 0,5 g алуминиеви стружки и кипенето се поддържа с обратен хладник за един час. Дестилира се веднага. Нужното количество калиев хидроксид се разтваря в дестилата. Остава се за няколко дни и се декантира чистата супернатантна течност от утайката от калиев карбонат.

Разтворът може също така да се приготви и без дестилация по следния начин: към 1000 ml етанол се добавят 4 ml алуминиев бутилат и сместа се оставя за няколко дни. Декантира се супернатантната течност и се разтваря нужното количество калиев хидроксид. Разтворът е готов за употреба.

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

## 1.3. Апаратура

Обикновено лабораторно оборудване, включващо:

## 1.3.1. аналитична везна

## 1.3.2. 250-милилитрова ерленмайерова колба

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

## 1.4. Ход на опита

## 1.4.1. Подготовка на пробата за изследване

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

## 1.4.2. Вземане на пробата

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

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

Пробата се претегля в ерленмайеровата колба (1.3.2.).

#### 1.4.3. Определяне

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

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

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

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

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

#### 1.5. Киселинност: изразена като процентно съдържание на олеинова киселина

Киселинността в проценти е равна на:

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

където:

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

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

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

m = теглото на пробата, в грамове.

Като резултат се приема средната аритметична стойност от двата израза.



## 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 прокаране на поток от чист сух инертен газ през него.

## 6.2. Ледена оцетна киселина, с качество за аналитични цели, освободена от кислород чрез прокаране 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.

## 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 оцветна 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.

## ПРИЛОЖЕНИЕ IV

## ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА АЛИФАТНИ АЛКОХОЛИ ЧРЕЗ КАПИЛЯРНА ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ

1. ПРЕДМЕТ  
Процедурата описва метод за определянето на съдържанието на алифатни алкохоли в маслата и мазнините.
2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА  
Масното вещество, след добавка на 1-ейкозанол като вътрешен стандарт, се осажда с етанолов калиев хидроксид, след което неосаждаемата материя се екстрахира с диетилов етер.  
Алкохолната фракция се отделя от неосаждаемата материя чрез хроматография върху слой от силикагел, импрегниран с калиев хидроксид; алкохолите, възстановени чрез силикагела, се трансформират в триметилсилил етери и се анализират чрез капилярна газова хроматография.
3. АПАРАТУРА
  - 3.1. 250-милилитрова колба с обратен хладник и снадки от шлифовано стъкло.
  - 3.2. Разделителни фунии с вместимост от 500 ml.
  - 3.3. Колби с вместимост от 250 ml.
  - 3.4. Хроматографска камера за тънкослоен хроматографски анализ, за стъклени плаки с размери 20 × 20 cm.
  - 3.5. УВ светлина с дължина на вълната 366 до 254 nm, за преглеждане на ТСХ плаки.
  - 3.6. Микропипета за изтегляне на 100 µl и на 500 µl.
  - 3.7. Синтерована стъклена филтрационна фуния с порьозна фрита G 3 (порьозност 15 до 40 µm) с диаметър приблизително 2 cm и височина приблизително 5 cm, подходяща за филтриране под вакуум и шлифована мъжка снадка 12/21.
  - 3.8. Вакуумна колба с вместимост 50 ml с шлифована женска снадка 12/21 за използване с филтрационната фуния (3.7.).
  - 3.9. Епруветка с вместимост 10 ml с конично дъно и тапа.
  - 3.10. Газов хроматограф за използване с капилярна колонка и снабден с разделителна система, състояща се от:
    - 3.10.1. термостатна камера за колонки (пещ за колонки) за поддържане на желаната температура с точност до ± 1 °C;
    - 3.10.2. термостатичен изпарителен агрегат (инжекционен вход) със стъкло със силиковъглеродно покритие;
    - 3.10.3. детектор за пламъчна йонизация и усилвателен преобразувател;
    - 3.10.4. записващ интегратор за използване с усилвателния преобразувател (3.10.3.), с време на отговор, което не превишава една секунда, и променлива скорост на подаване на хартията;
  - 3.11. Стъклена или кварцова капилярна колонка с дължина 20 до 30 m, вътрешен диаметър 0,25 до 0,32 mm, с течна фаза с SE-52 или SE-54 или еквивалентна, с плътност на слоя между 0,10 и 0,30 µm.
  - 3.12. Микроспринцовка със закалена игла за газова хроматография с вместимост 10 µl.
4. РЕАКТИВИ
  - 4.1. Приблизително 2 Mol/L етанолов разтвор на калиев хидроксид: 130 g калиев хидроксид (минимална концентрация 85 %) се разтваря, с охлаждане, в 200 ml дестилирана вода и се долива до един литър с етанол. Разтворът трябва да се съхранява в добре затворени стъклени бутилки с тъмен цвят.
  - 4.2. Диетилов етер, пречистен за аналитични цели.
  - 4.3. Безводен натриев сулфат, пречистен за аналитични цели

- 4.4. Стъклени ТСХ плаки със силикагел, без флуоресцентен индикатор, с дебелина 0,25 mm (могат да се доставят от търговската мрежа).
- 4.5. Приблизително 0,2 Mol/L етанолов разтвор на калиев хидроксид: 13 g калиев хидроксид се разтварят в 20 ml дестилирана вода и се доливат до един литър с етанол.
- 4.6. Бензен, за хроматография. (виж 5.2.2.).
- 4.7. Ацетон, за хроматография. (виж 5.2.2.).
- 4.8. Хексан, за хроматография. (виж 5.2.2.).
- 4.9. Диетилов етер, за хроматография. (виж 5.2.2.).
- 4.10. Хлороформ, за хроматография. (виж 5.2.2.).
- 4.11. Стандартен разтвор за тънкослойна хроматография: смес от 5 % алкохоли от C<sub>20</sub> до C<sub>28</sub> в хлороформ.
- 4.12. 0,2 % разтвор на 2,7-дихлорофлуоресцин в етанол. Той се алкализира слабо чрез добавяне на няколко капки 2 Mol/L разтвор на калиев хидроксид.
- 4.13. Безводен пиридин, за хроматография.
- 4.14. Хексаметилдисилазан.
- 4.15. Триметилхлоросилан.
- 4.16. Стандартни разтвори на триметилсилил етери на алифатните алкохоли от C<sub>20</sub> до C<sub>28</sub>. Те могат да се приготвят от смеси от чисти алкохоли по времето, по което са необходими за употреба.
- 4.17. 0,1 % (m/v) разтвор на 1-ейкозанол в CHCl<sub>3</sub> (вътрешен стандарт).
- 4.18. Газове носители: водород и хелий, пречистени за газова хроматография.
- 4.19. Спомагателни газове:
- водород, пречистен за газова хроматография,
  - въздух, пречистен за газова хроматография.

## 5. ХОД НА ОПИТА

- 5.1. Подготовка на неосапуняемата материя.
- 5.1.1. С помощта на микроспринцовка се поставя в 250-милилитрова колба обем от 0,1 % разтвор на 1-ейкозанол (може да се използва и 1-енейкозанол) (4.17.), съдържащ количество от 1-ейкозанол, приблизително равно на 10 % съдържание на алифатни алкохоли в количеството от пробата, взето за анализ. Например към 5 g от пробата се добавят 250 µl от 0,1 % разтвор на 1-ейкозанол, ако се анализира маслиново масло или масло от семена, и 1500 µl, ако пробата е маслиново масло от остатъчен материал. Изпарява се вътрешният стандартен разтвор до сухо под N<sub>2</sub>.
- Количествено се претеглят в колбата приблизително 5 g от сухата филтрирана проба.
- 5.1.2. Добавят се 50 ml от 2 Mol/L етанолов разтвор на калиев хидроксид, поставя се обратния хладник и апаратът се нагрява до леко кипене на парна баня и се разбърква непрекъснато в процеса на нагряването, докато се извърши осапуняването (разтворът се избистря). Нагряването продължава още 20 минути и след това се добавят 50 ml дестилирана вода през кондензатора, след това кондензаторът се отстранява и колбата се охлажда до приблизително 30 °C.
- 5.1.3. Съдържанието на колбата се прехвърля количествено в разделителна фуния с вместимост 500 ml и колбата се изплаква с 2 × 25 ml дестилирана вода. Добавят се приблизително 80 ml диетилов етер, цялата смес се разклаща енергично в продължение на 30 секунди и двете фази се оставят да се разделят (бележка 1).
- Долната водна фаза се пренася във втора фуния. По същия начин се извършват две по-нататъшни екстракции на водната фаза, като всеки път се използват 60 до 70 ml диетилов етер.
- Бележка 1:* Емулсиите могат да се елиминират чрез добавянето чрез пулверизиране на малки количества етилов алкохол или метилов алкохол.
- 5.1.4. Диетиловите етерни екстракти се смесват в разделителна фуния и се промиват в дестилирана вода (по 50 ml всеки път), докато промивната вода не получи неутрална реакция.
- Отстранява се водната фаза, изсушава се етерната фаза с безводен натриев сулфат и се филтрира в колба с вместимост от 250 ml, която е била претеглена предварително, като фунията и филтърът се промиват с малки количества диетилов етер, които се прибавят към общия обем.

- 5.1.5. Етерът се изпарява чрез внимателно подгряване до няколко милилитра и след това се изсушава под слаб вакуум или под поток от азот; изсушаването се довършва в пещ при 100 °C за приблизително 15 минути и остатъкът се претегля след охлаждане в десикатор.
- 5.2. Отделяне на алкохолните фракции.
- 5.2.1. Приготвяне на основни плаки ТСХ (4.4.). Плаките се потапят напълно в 0,2 Mol/L разтвор на калиев хидроксид за 10 секунди и след това се оставят да съхнат под камина за два часа и накрая се поставят в пещ при 100 °C за един час.
- Плаките се вземат от пещта и се съхраняват в десикатор с калциев хлорид до момента на употреба. Така обработените плаки могат да се използват в рамките на две седмици.
- Бележка 2:* Когато се използват основни плаки със силикагел за отделяне на алкохолната фракция, не е необходимо неосапуняемите вещества да се обработват с  $Al_2O_3$ . Поради това всички кисели вещества (мастни киселини и други) се задържат в началната точка, от което се получават както ивици от алифатни алкохоли, така и терпенови ивици, като и двете са ясно отграничени от стероловата ивица.
- 5.2.2. В проявителната камера се налива разтвор на бензен и ацетон в обемно съотношение 9:5 до приблизителна дълбочина от 1 cm. Като алтернативна възможност може да се използва смес от хексан и диетиллов етер в обемно съотношение 65:35. Камерата се затваря се оставя за не по-малко от половин час, за да се установи равновесие между парите и течността. Към вътрешните повърхности на камерата могат да се прикрепят ивици от филтърна хартия, потопени в отмивния агент, с оглед намаляването на времето за проявяване с приблизително една трета и постигането на по-равномерно, правилно отмиване на съставките.
- Бележка 3:* Проявителният разтвор трябва да се подменя преди всеки анализ, с оглед на получаването на възпроизводими условия за проявяване.
- 5.2.3. Подготвя се приблизително 5 % разтвор от неосапуняема материя (5.1.5.) в хлороформ и 300 µl от развора се нанася на възможно най-тънка равномерна ивица, с помощта на микроспринцовката с вместимост 100 µl, на плака за ТСХ на приблизително 2 cm от долния край на плаката. Наравно с ивицата се накапват 2 до 3 µl от стандартния разтвор на алифатни алкохоли (4.1.1.) за разпознаването на ивицата от алифатни алкохоли след завършването на проявяването.
- 5.2.4. Плаката се поставя в проявителната камера, както е указано в 5.2.2. Температурата се поддържа между 15 и 20 °C. Камерата се затваря веднага и пробата се оставя за отмиване, докато фронтът на разтворителя достигне на разстояние 1 cm от горния край на плаката. След това плаката се отстранява от проявителната камера и разтворителят се изпарява под горещ въздушен поток или плаката се оставя под камината.
- 5.2.5. Плаката се напръсква леко и равномерно с развора на 2,7-дихлорофлуоресцин и когато се наблюдава под ултравиолетова светлина, ивицата от алифатни алкохоли се разпознава чрез сравняване с алифатните алкохоли в ивицата непосредствено над нея, която е ивицата от тритерпenni алкохоли, и се очертават заедно.
- Бележка 4:* Изискването за съвместното отстраняване на ивицата от алифатни алкохоли и ивицата от тритерпenni алкохоли се определя от възможната миграция на някои алифатни алкохоли към ивицата на тритерпеновите алкохоли.
- 5.2.6. Силикагелът, включен в тази очертана област, се изчегъртва с метална шпатула. Отделеният материал се наброява на малки частици и се поставя във филтърна фуния (3.7.), добавят се 10 ml горещ хлороформ. Съдържанието се размесва добре с металната шпатула и се филтрира под вакуум, като филтратът се събира в колбата (3.8.), която е свързана с филтърната фуния.
- Утайката от фунията се промива  $3 \times 10$  ml с етилов етер, като филтратът се събира в същата колба, свързана с филтърната фуния. Филтратът се изпарява до обем приблизително 4 до 5 ml и остатъчният разтвор се излива в епруветка с вместимост 10 ml (3.9.), която е била претеглена предварително; епруветката се изсушава чрез леко подгряване под азотен поток. Утайката се разтваря отново с няколко капки ацетон, изсушава се отново, след което се поставя в пещ при 105 °C за 10 минути, изважда се и се охлажда в десикатор и се претегля.
- Остатъкът в епруветката се състои от алкохолната фракция.
- 5.3. Подготовка на триметилсилиловите етери.
- 5.3.1. Реактивът за силилация, състоящ се от смес от пиридин-хексаметилдисилазан-триметилхлоросилан в обемно съотношение 9:3:1 се добавя в епруветката, съдържаща алкохолната фракция, в съотношение 50 µl за всеки милиграм алкохоли, като се избягва абсорбцията на влага (бележка 6).
- Бележка 5:* Готови за употреба разтвори могат да се доставят от търговската мрежа; силанизиращите реактиви като N, 0-бис (триметилсилил) трифлуороацетамид + 1 % триметилхлоросилан за смесване със същия обем безводен пиридин.

- 5.3.2. Епруветката се затваря и внимателно се разклаща без да се преобръща, докато алкохолите се разтворят. След това се оставя за поне 15 минути при стайна температура и после се центрофутира за няколко минути; бистрият разтвор е готов за газов хроматографски анализ.
- Бележка 6:* Всяко образуване на слаба опалесценция е нормално и не повлиява по никакъв начин. Формирането на бял флокулат или появяването на розово оцветяване е знак за наличието на влага или за увреждането на реактива. В този случай опитът се повтаря.
- 5.4. Газов хроматографски анализ
- 5.4.1. Предварителни операции и кондициониране на капилярната колонка.
- 5.4.1.1. Капилярната колонка се поставя в газовия хроматограф чрез свързване на началото на колонката с изпарителя, който е свързан с разделителната система, а края на колонката — с детектора.
- Извършва се обща проверка на газохроматографския агрегат (здравина на газовите уплътнения, ефикасност на детектора, ефективност на разделителната система и на записващата система и т.н.).
- 5.4.1.2. Капилярните колонки, които се използват за пръв път, трябва да бъдат кондиционирани. Прокарва се малко газ носител през капилярната колонка, след което газохроматографският агрегат се включва и се постига постепенно нагряване до достигането и поддържането на температура не по-ниска от 20 °C над температурата за експлоатация (виж бележка 7). Тази температура се поддържа за не по-малко от два часа, след което агрегатът се привежда в работен режим (регулация на газовия поток, възпламеняване на разделителния пламък, свързване с електронното записващо устройство, настройване на температурата на пещта за капилярни колонки, детектора и инжектора и тъй нататък) и сигналът се настройва на чувствителност не по-ниска от двукратно най-високото ниво, очаквано за провеждане на анализа. Основната линия трябва да е права, лишена от пикове от какъвто и да било произход и не трябва да показва признаци на изместване.
- Отрицателното праволинейно изместване е показател за неизправно уплътняване на колонковите свързки, докато положителното изместване е показател за недостатъчно кондициониране на колонката.
- Бележка 7:* Температурата на кондициониране трябва да е поне с 20 °C по-ниска от максималната температура, очаквана за използваната течна фаза.
- 5.4.2. Избор на условията за експлоатацията.
- 5.4.2.1. Общите условия за експлоатацията са следните:
- температура на колонките: първоначалната изотерма се настройва на 180 °C за осемдесет минути и след това се програмира на 5 °C/минута до 260 °C и по-нататък 15 минути при 260 °C,
  - температура на изпарителя: 280 °C,
  - температура на детектора: 290 °C,
  - линейна скорост на газа носител: хелий — 20 до 35 cm/sec, водород — 30 до 50 cm/sec,
  - съотношение на разделяне: 1:50 до 1:100,
  - чувствителност на инструмента: 4 до 16 пъти минималното намаляване,
  - чувствителност на записване: 1 до 2 mV fs,
  - скорост на подаване на хартията: 30 до 60 cm/h,
  - количество на инжектираното вещество: 0,5 до 1 µl от разтвора на ТМСЕ.
- Гореспомнатите условия могат да се променят съгласно характеристиките на колонковата и на газовата хроматография, с оглед получаването на хроматограми, задоволяващи следните условия:
- времето за задържане на алкохол C<sub>26</sub> да е 18 ± 5 минути,
  - пикът на алкохол C<sub>22</sub> да е 80 ± 20 % от пълната стойност за маслиновото масло и 40 ± 20 % от пълната стойност за маслото от семена.
- 5.4.2.2. Преждеупомнатите изисквания се проверяват чрез повтарящо се впръскване на стандартна смес от ТМСЕ на алкохоли, като условията за експлоатация се настройват за получаване на възможно най-добрите резултати.
- 5.4.2.3. Параметрите за интегриране на пиковете трябва да се нагласят, така че да се постигне правилна оценка на споменатите пикове.
- 5.4.3. Провеждане на анализа.
- 5.4.3.1. С помощта на микропипетата с вместимост 10 µl се въвежда 1 µl хексан с последващо въвеждане на 0,5 µl въздух и впоследствие — 0,5 до 1 µl от разтвора на пробата; буталото на спринцовката се повдига, за да се изпразни иглата.
- Иглата се въвежда през преградата на уреда за инжектиране и след една до две секунди разтворът се инжектира бързо, а иглата се изважда бавно след приблизително пет секунди.
- 5.4.3.2. Извършва се запис до пълното отмиване на наличните ТМСЕ на алкохолите. Основната линия трябва винаги да съответствува на изискванията на точка 5.4.1.2.
- 5.4.4. Разпознаване на пиковете.
- Разпознаването на индивидуалните пикове се извършва съгласно времената за задържане и в сравнение със стандартната смес от ТМСЕ, анализирана при същите условия.
- Хроматограма на алкохолната фракция на необработеното маслиново масло virgin е показана на фигура 1.
- 5.4.5. Количествена преценка.
- 5.4.5.1. Лицата на пиковете на 1-ейкозанола и на алифатните алкохоли C<sub>22</sub> до C<sub>26</sub> се изчисляват чрез електронна интеграция.

5.4.5.2. Съдържанието на всеки от алкохолите, изразен в mg/100 g мастно вещество, се изчислява по следния начин:

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

където:

$A_x$  = лице на пика на алкохола x, в квадратни милиметри;

$A_s$  = лице на пика на 1-ейкозанола, в квадратни милиметри;

$m_s$  = масата на 1-ейкозанола, в милиграми;

$m$  = масата на пробата, взета за определяне, в граме.

#### 6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

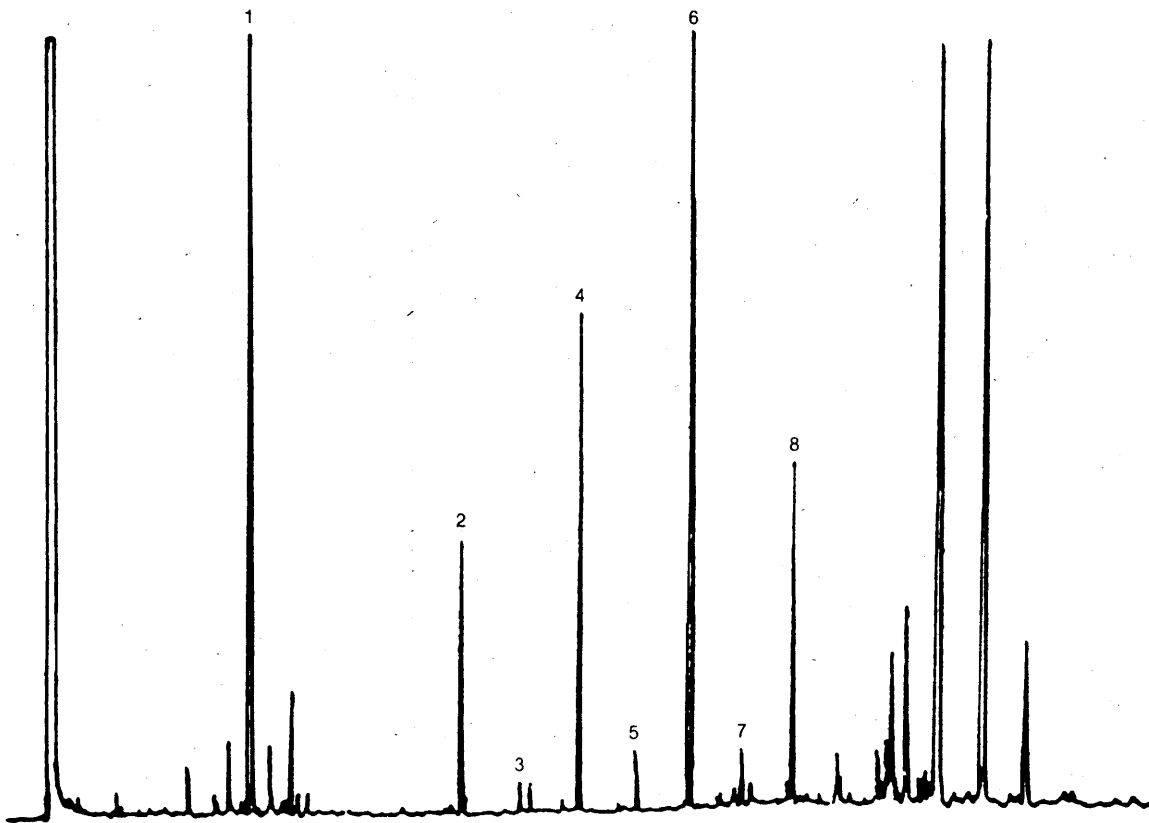
Докладва се съдържанието на отделните алифатни алкохоли в mg/100 g мастно вещество и сумата от „общото количество алифатни алкохоли“.

#### ДОПЪЛНЕНИЕ

##### Определяне на линейната скорост на газа

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

Линейната скорост на газа, в cm/sec, е представена чрез  $L/t_M$ , където L е дължината на колоната, в сантиметри, а  $t_M$  е времето, в секунди, измерено с помощта на секундомера.



Фигура 1. Хроматограма на алкохолната фракция за студенопресованото маслиново масло.

1 = Ейкозанола (SI)

2 = Докозанола

3 = Трикозанола

4 = Тетракозанола

5 = Пентакозанола

6 = Хексакозанола

7 = Хептакозанола

8 = Остаканола

## ПРИЛОЖЕНИЕ V

## ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪСТАВА И СЪДЪРЖАНИЕТО НА СТЕРОЛИ ЧРЕЗ КАПИЛЯРНОКОЛОНКОВА ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ

## 1. ОБХВАТ

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

## 2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Масното вещество, след добавянето на  $\beta$ -холестанол като вътрешен стандарт, се осажда с етанолов разтвор на калиев хидроксид и неосаждаемите съставки се екстрахират с помощта на диетилов етер.

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

## 3. АПАРАТУРА

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

## 4. РЕАКТИВИ

- 4.1. Приблизително 2 mol/L етанолов разтвор на калиев хидроксид. Разтварят се 130 g калиев хидроксид (минимална концентрация 85 %), с охлаждане, в 200 ml дестилирана вода и се долива до един литър с етанол. Разтворът трябва да се съхранява в добре затворени стъклени бутилки с тъмен цвят.



- 4.2. Диетилов етер, пречистен за аналитични цели.
- 4.3. Безводен натриев сулфат, пречистен за аналитични цели
- 4.4. Стъклени плаки, обвити със силикагел, без флуоресцентен индикатор, с дебелина 0,25 mm (могат да се доставят от търговската мрежа).
- 4.5. 0,2 mol/L етанолов разтвор на калиев хидроксид: 13 g калиев хидроксид се разтварят в 20 ml дестилирана вода и се доливат до един литър с етанол.
- 4.6. Бензен, за хроматография. (Виж 5.2.2.).
- 4.7. Ацетон, за хроматография. (Виж 5.2.2.).
- 4.8. Хексан, за хроматография. (Виж 5.2.2.).
- 4.9. Диетилов етер, за хроматография. (Виж 5.2.2.).
- 4.10. Хлороформ, пречистен за аналитични цели. (Виж 5.2.2.).
- 4.11. Стандартен разтвор за тънкослойна хроматография: 5 % разтвор в хлороформ на холестерол или фитостероли.
- 4.12. 0,2 % разтвор на 2,7-дихлорофлуоресцин в етанол. Той се алкализира слабо чрез добавяне на няколко капки 2 mol/L алкохолен разтвор на калиев хидроксид.
- 4.13. Безводен пиридин, за хроматография.
- 4.14. Хексаметилдисилазан.
- 4.15. Триметилхлоросилан.
- 4.16. Стандартни разтвори на триметилсилил етери. Те се приготвят в момента на употреба от чисти стероли или смеси от стероли, получени от масла, които ги съдържат.
- 4.17. 0,2 % разтвор (m/V) на  $\beta$ -холестанол в хлороформ (вътрешен стандарт).
- 4.18. Газове носители: водород и хелий, пречистени за газова хроматография.
- 4.19. Спомагателни газове:
  - водород, пречистен за газова хроматография;
  - въздух, пречистен за газова хроматография.

## 5. ХОД НА ОПИТА

- 5.1. Приготвяне на неосапуняемите съставки.
  - 5.1.1. С помощта на спринцовка с вместимост 500  $\mu$ l се поставя в 250-милилитрова колба обем 0,2 % разтвор на  $\alpha$ -холестанол в хлороформ (4.17.), съдържащ такова количество холестерол, което съответства на приблизително 10 % от стероловото съдържание на аликвотната част от пробата, взета за определяне. Например за 5 g от пробата се добавят 500  $\mu$ l от 0,2 % разтвор на  $\alpha$ -холестанол, когато става въпрос за маслиново масло и 1500  $\mu$ l — за масло от маслиново къспе.

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

Животинските или растителни масла и мазнини, съдържащи значителни количества холестерол могат да покажат пик, имаш време на задържане, идентичен с този на холестерола. Ако това се прояви, стероловата фракция следва да се анализира двукратно със и без вътрешен стандарт.
  - 5.1.2. Добавят се 50 ml 2 mol/L етанолов разтвор на калиев хидроксид, поставя се обратният хладник и се подгрива до слабо кипене на водна баня с непрекъснато силно разбъркване, докато се извърши осапуняването (разтворът се избистря). Нагриването се продължава за още 20 минути, след което се прибавят 50 ml дестилирана вода до върха на хладника, хладникът се отстранява, а колбата се охлажда до приблизително 30 °C.
  - 5.1.3. Съдържанието на колбата се прехвърля количествено в 500 ml разделителна фуния с помощта на няколко промивки с дестилирана вода, възлизаща общо на около 50 ml. Прибавят се приблизително 80 ml диетилов етер, разклаща се енергично в продължение на около 30 секунди и се оставя да се утаи (бележка 1).

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

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

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

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

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

- 5.2. Отделяне на стероловата фракция.

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

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

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

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

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

- 5.2.3. Подготвя се приблизително 5 % разтвор на неосапуняеми съставки (5.1.5.) в хлороформ и 300 µl от разтвора се нанася на възможно най-тънка равномерна ивица с помощта на микроспринцовката с вместимост 100 µl на плака за хроматография на приблизително 2 cm от единия край на плаката. На същото равнище като ивицата се на капват 2 до 3 µl от стандартния разтвор (4.1.1.) за разпознаването на ивицата от алифатни алкохоли след завършването на проявяването.

- 5.2.4. Плаката се поставя в проявителната камера както е указано в 5.2.2. Температурата се поддържа между 15 и 20 °C. Камерата се затваря с капак веднага и пробата се оставя за отмиване, докато фронтът на разтворителя достигне на разстояние 1 cm от горния край на плаката. След това плаката се изважда от проявителната камера и разтворителят се изпарява под горещ въздушен поток или плаката се оставя под камината.

- 5.2.5. Плаката се напръсква леко и равномерно с разтвора на 2,7-дихлорофлуоресцин. Когато плаката се наблюдава под ултравиолетова светлина, ивицата от стероли може да се разпознае като се обедини с петното, получено от стандартния разтвор. Границите на ивицата по краищата на флуоресценцията се очертават с черен молив.

- 5.2.6. Силикагелът, включен в тази определена област, се изчегъртва с метална шпатула. Отделеният надробен материал от силикагел се поставя във филтърната фуния (3.7.). Прибавят се 10 ml горещ хлороформ, разбърква се добре с металната шпатула и се филтрира под вакуум, като филтратът се събира в колбата (3.8.), която е свързана с филтърната фуния.

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

Остатъкът в епруветката се състои от стероловата фракция.

- 5.3. Подготовка на триметилсилиловите етери.

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

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

- 5.3.2. Епруветката се затваря, внимателно се разклаща (без да се преобръща), докато стеролите се разтворят. След това се оставя за поне 15 минути при стайна температура и после се центрофугира за няколко минути. Бистрият разтвор е готов за газов хроматографски анализ.
- Бележка 5:* Слабата опалесценция, която може да се получи, е нормална и не влияе по никакъв начин. Формирането на бял флокулат или появяването на розово оцветяване е знак за наличието на влага или за увреждането на реактива. В този случай опитът се повтаря.
- 5.4. Газов хроматографски анализ
- 5.4.1. Предварителни операции, запълване на колонката.
- 5.4.1.1. Капилярната колонка се поставя в газовия хроматограф чрез свързване на входния край с изпарителя, който е свързан с разделителната система, а изходния край — с детектора.
- Извършва се обща проверка на газохроматографския агрегат (течове от газовите вериги, ефикасност на детектора, ефективност на разделителната система и на записващата система и тъй нататък).
- 5.4.1.2. Ако колонката се използва за пръв път, се препоръчва да бъде подложена на кондициониране. Прокарва се слаб поток от газ през колонката, след което газохроматографският агрегат се включва и се започва постепенно нагряване до достигането и поддържането на температура от поне 20 °C над температурата от експлоатация (бележка 6). Тази температура се поддържа за поне два часа, след което целият агрегат се привежда в работен режим (настройка на газовия поток и разделянето, възпламеняване на пламъка, свързване с електронното записващо устройство, настройване на температурата на пещта за капилярни колонки, детектора и инжектора и тъй нататък) и се записва сигналът с поне два пъти по-голяма чувствителност от тази, която ще се използва при анализа. Ходът на основната линия трябва да е прав, без пикове от какъвто и да било вид и не трябва да се измества.
- Отрицателно праволинейно изместване е показател за изтичане от колонковите свързки; положителното изместване е показател за неподходящо кондициониране на колонката.
- Бележка 6:* Температурата на кондициониране трябва да е винаги поне с 20 °C по-ниска от максималната температура, определена за използваната стационарна фаза.
- 5.4.2. Избор на условията за работа.
- 5.4.2.1. Насоката за условията за работа е следната:
- температура на колонките: 260 °C ± 5 °C,
  - температура на изпарителя: 280 °C,
  - температура на детектора: 290 °C,
  - линейна скорост на газа носител: хелий — 20 до 35 cm/sec, водород — 30 до 50 cm/sec,
  - съотношение на разделяне: 1:50 до 1:100,
  - чувствителност на инструмента: 4 до 16 пъти минималното намаляване,
  - чувствителност на записване: 1 до 2 mV f.s.,
  - скорост на подаване на хартията: 30 до 60 cm/h,
  - количество на инжектираното вещество: 0,5 до 1 µl от разтвора на ТМСЕ.
- Тези условия могат да се изменят в светлината на характеристиките на колонковата и газовата хроматография, с оглед получаването на хроматограми, задоволителни следните условия:
- времето за задръжане на β-ситостерола трябва да е 20 ± 5 минути,
  - пикът на кампестерола трябва да е: за маслиновото масло (общо съдържание 3 %) — 15 ± 5 % от пълната стойност; за соевото масло (общо съдържание 20 %) — 80 ± 10 % от пълната стойност
  - всички налични стероли трябва да са отделени. В добавка на това, че трябва да са разделени, пиковите трябва да бъдат също така напълно отделени един от друг, т.е. следата на пика трябва да се върне напълно до основата, преди да се издигне за следващия пик. Непълното отделяне обаче се допуска, като е предвидено, че пикът при TRR 1,02 може да се изрази количествено чрез използването на перпендикуляра.
- 5.4.3. Провеждане на анализа.
- 5.4.3.1. С помощта на микропипетата с вместимост 10 µl се изтегля 1 µl хексан, въвежда се 0,5 µl въздух и впоследствие — 0,5 до 1 µl от разтвора на пробата. Буталото на спринцовката се повдига, за да се изпразни иглата. Иглата се въвежда през мембраната на мястото за инжектиране и след една до две секунди разтворът се инжектира бързо, а иглата се изважда бавно след приблизително пет секунди.
- 5.4.3.2. Извършва се запис до пълното отмиване на наличните ТМСЕ на стеролите.
- Основната линия трябва да отговаря на изискванията на точка 5.4.1.2.
- 5.4.4. Разпознаване на пиковите.
- Разпознаването на индивидуалните пикове се извършва съгласно времената за задръжане и в сравнение със смеси от стеролови ТМСЕ, анализирани при същите условия.
- Стеролите се отмиват в следния ред: холестерол, брасикастерол, 24-метиленхолестерол, кампестерол, кампестанол, стигмастерол, Δ 7-кампестерол, Δ 5,23-стигмастиадиенол, клеростерол, β-ситостерол, ситостанол, Δ 5-авенастерол, Δ 5,24-стигмастиадиенол, Δ 7-стигмастенон, Δ 7-авенастерол.

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

Фигури 1 и 2 показват типични хроматограми за някои масла.

5.4.5. Количествена преценка.

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

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

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

където:

$A_x$  = лицето на пика за стерола, в квадратни милиметри;

$A_s$  = лицето на пика на  $\beta$ -холестанола, в квадратни милиметри;

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

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

6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

6.1. Записват се индивидуалните концентрации на стеролите в mg/100 g мастно вещество, а сборът им като общо количество на стеролите.

6.2. Изчислява се процентното съдържание на всеки отделен стерол чрез отношение на имащото значение лице на пика към сбора от лицата на пиковите на стеролите.

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

където:

$A_x$  = лицето на пика за  $x$ ;

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

#### ДОПЪЛНЕНИЕ

##### Определяне на линейната скорост на газа

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

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

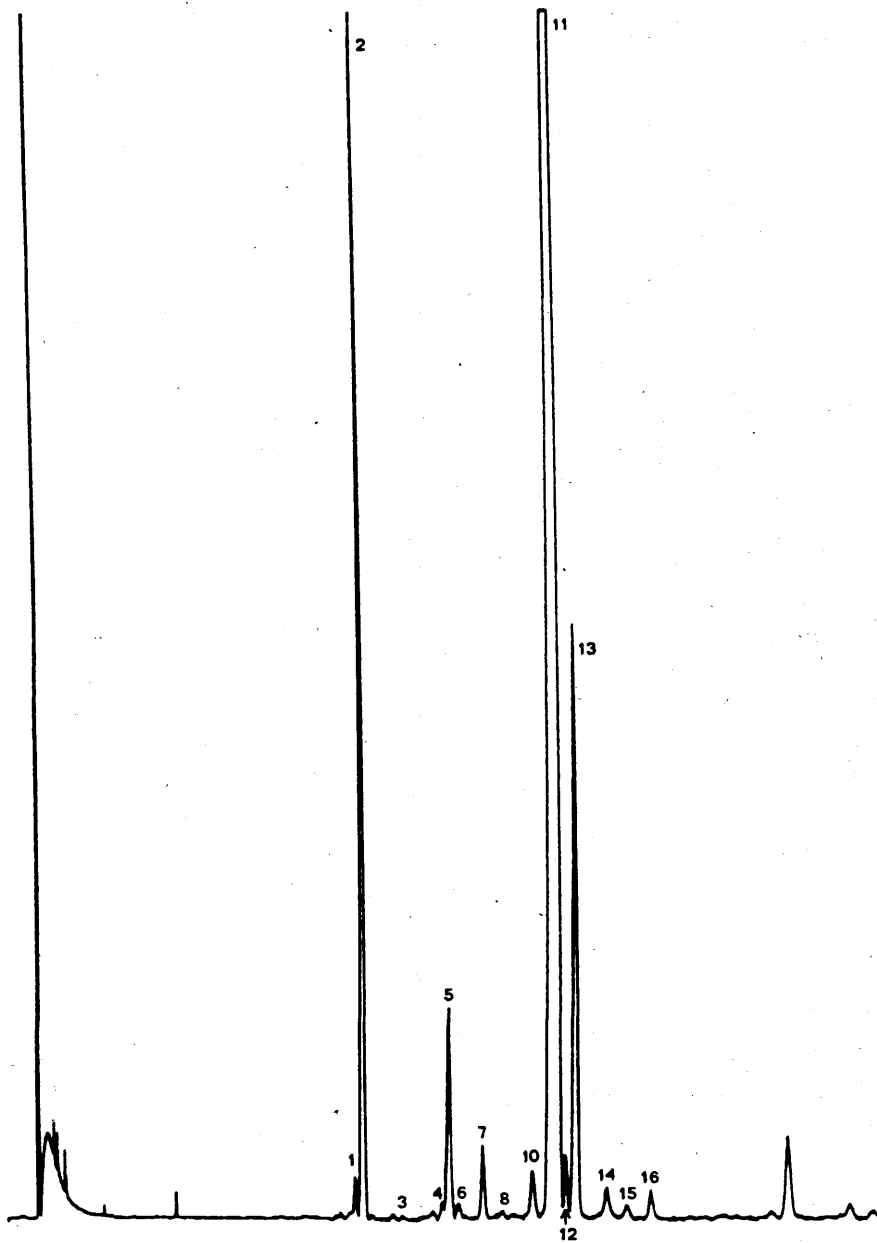
Таблица 1

Относително време за задържане за стеролите

Пик	Идентификация		Относително време за задържане	
			SE 54 колонка	SE 52 колонка
1	холестерол	$\Delta$ -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
4	24-метилен-холестерол	24-метилен- $\Delta$ -5,24-холестен-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-метил-холестан-3 $\beta$ -ол	0,85	0,82
7	стигмастерол	[24R]-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	хлростерол	[24S]-24-етил- $\Delta$ -5,25-холестадиен-3 $\beta$ -ол	0,96	0,96
11	$\beta$ -ситостерол	[24R]-24-етил- $\Delta$ -5-холестан-3 $\beta$ -ол	1,00	1,00
12	ситостанол	24-етил-холестан-3 $\beta$ -ол	1,02	1,02
13	$\Delta$ -5-авенастерол	[24Z]-24-етилиден-5-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- $\Delta$ 7,24-холестадиен-3 $\beta$ -ол	1,12	1,12
16	$\Delta$ -7-авенастерол	[24Z]-24-етилиден- $\Delta$ -7-холестен-3 $\beta$ -ол	1,16	1,16

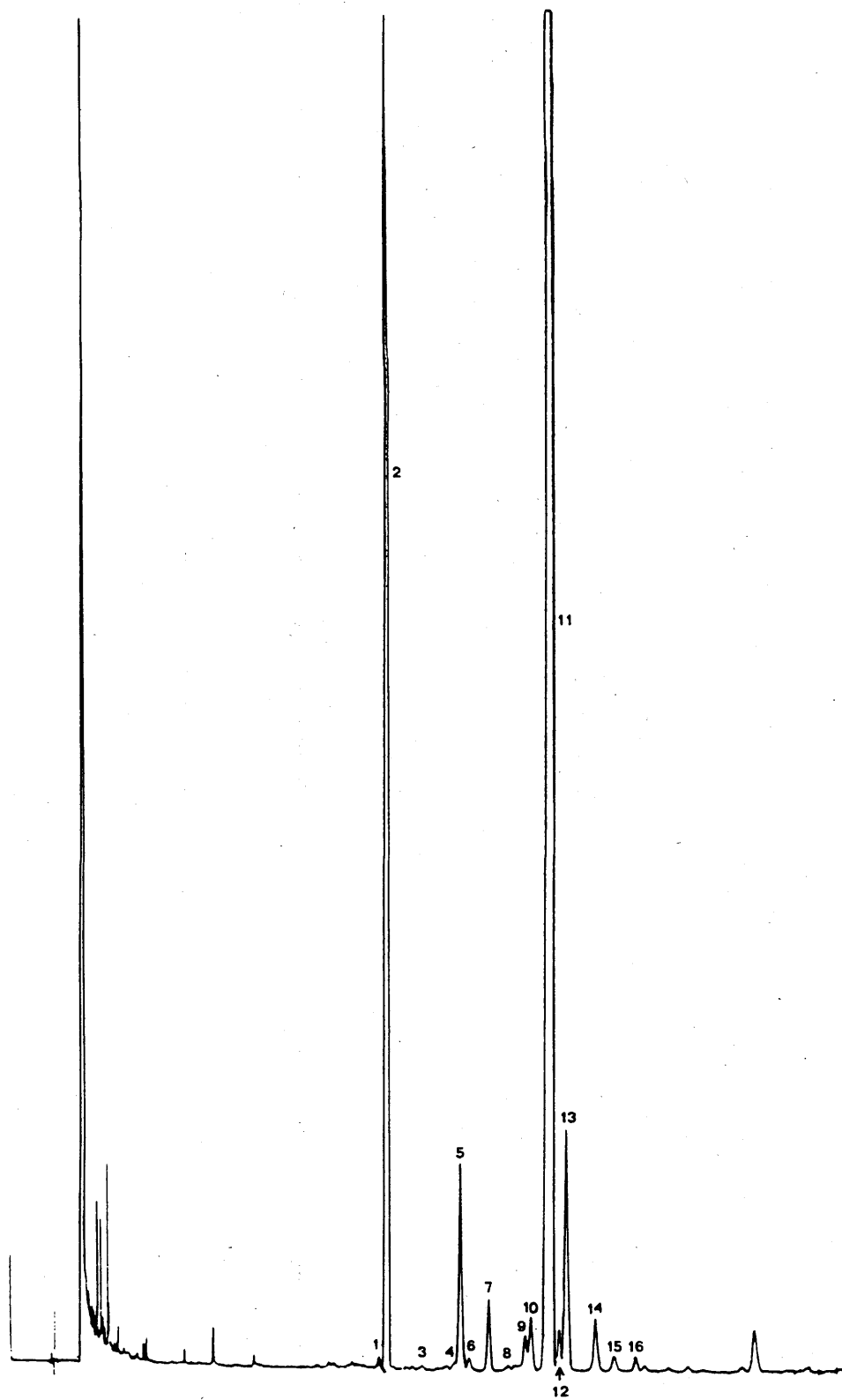
## Фигура 1

Газова хроматограма на стероловата фракция на нерафинирано маслиново масло



## Фигура 2

Газова хроматограма на стероловата фракция на рафинирано маслиново масло



## ПРИЛОЖЕНИЕ VI

## ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА ЕРИТРОДИОЛ И УВАОЛ

## ВЪВЕДЕНИЕ

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

## 1. ОБХВАТ

Методът описва процедура за откриване на еритродиол в мастни вещества.

## 2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

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

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

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

## 3. АПАРАТУРА

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

## 4. РЕАКТИВИ

4.1. Реактивите, описани в приложение V (определяне на съдържанието на стероли).

4.2. Стандартен разтвор на еритродиол — 0,5 % разтвор в хлороформ.

## 5. ХОД НА ОПИТА

## 5.1. Подготовка на неосапуняемите вещества

Както е описано в параграф 5.1.2. от приложение V.

## 5.2. Отделяне на еритродиола и стеролите.

5.2.1. Виж параграф 5.2.1. от приложение V.

5.2.2. Виж параграф 5.2.2. от приложение V.

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

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

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

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

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



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

5.3. **Подготовка на триметилсилил естерите**

Както е описано в параграф 5.3. от приложение V.

5.4. **Газовохроматографски анализ**

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

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

6. **ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

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

където:

$A_1$  = лицето на пика за еритродиола, в квадратни милиметри;

$A_2$  = лицето на пика за уваола, в квадратни милиметри;

$\sum A_{\text{стероли}}$  = сборът от лицата на пиковите на стеролите, в квадратни милиметри.

Резултатът се изразява до една цифра след десетичната запетая.

## ПРИЛОЖЕНИЕ VII

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА МАСТНИТЕ КИСЕЛИНИ НА ВТОРО МЯСТО В ТРИГЛИЦЕРИДИТЕ В МАСЛАТА И  
МАЗНИНИТЕ**

## 1. ОБХВАТ

Стандартът описва метод за определянето на състава на тази фракция от мастните киселини на дадено масло или мазнина, която е естерифицирана на второ място (или вътрешно място) на глицерола.

## 2. ПРИЛОЖНО ПОЛЕ

Стандартът е приложим за масла и мазнини, които имат точка на топене под 45 °C, поради особеностите в активността на панкреатичната липаза.

Не е напълно приложим за масла и мазнини, съдържащи значителни количества от: мастни киселини с 12 или по-малко въглеродни атома (кокосово масло и масло от копра, млечна мазнина) или силно ненаситени мастни киселини (с повече от четири двойни връзки), съдържащи 20 или повече въглеродни атома (рибено масло и масла от морски животни), или мастни киселини, съдържащи оксигенирани групи, различни от карбоксилната група.

## 3. ПРИНЦИП

Възможната неутрализация на киселите масла в разтворител. Пречистване чрез пасиране върху колона от диалуминиев триоксид. Частична хидролиза на триглицеридите под действието на панкреатичната липаза за определено време. Отделяне на образуваните моноглицериди чрез тънкослойна хроматография и метанолиза на тези моноглицериди. Анализ на тези метилови естери чрез газово-течностна хроматография.

## 4. АПАРАТУРА

- 4.1. 100-милилитрова колба с кръгло дъно.
- 4.2. 25-милилитрова колба с кръгло дъно и шлифовано гърло.
- 4.3. Кондензатор, дълъг 1 m, който се свързва с колбата 4.2.
- 4.4. 250-милилитрова конична колба.
- 4.5. 50-милилитрова мензура.
- 4.6. 500-милилитрова разделителна фуния.
- 4.7. Стъклена колонка за хроматография, с вътрешен диаметър 13 mm, дължина 400 mm, снабдена с диск с поресто дъно и тапа.
- 4.8. 10-милилитрова епруветка за центрофугиране с капачка от шлифовано стъкло.
- 4.9. 5-милилитрова бюрета, градуирана на 0,05 ml.
- 4.10. 1-милилитрова спринцовка за подкожни инжекции, снабдена с тънка игла.
- 4.11. Микропипета, за отмерване на капки от 3 до 4 µl.
- 4.12. Разпределител за тънкослойна хроматография.
- 4.13. Стъклени плаки за тънкослойна хроматография, 20 × 20 cm.
- 4.14. Стъклена камера за проявяване за тънкослойна хроматография, с капак от шлифовано стъкло, подходящ за плаките с размер 20 × 20 cm.
- 4.15. Пулверизатор за тънкослойна хроматография.
- 4.16. Пещ, настроена на 103 ± 2 °C.
- 4.17. Термостат, който може да се настройва между 30 и 45 °C с точност от 0,5 °C.
- 4.18. Ротационен изпарител.
- 4.19. Вибрационен електрически шутел-апарат, позволяващ силно разбъркване на епруветката за центрофугиране.
- 4.20. Ултравioletова лампа за преглеждане на тънкослойните плаки.

За контрол на активността на липазата:

- 4.21. рН-метър.
- 4.22. Спирална бъркалка.
- 4.23. 5-милилитрова бюрета.
- 4.24. Секундомер.

За евентуалното приготвяне на липазата:

- 4.25. Лабораторна бъркалка, подходяща за диспергиране и смесване на хетерогенни материали.

## 5. РЕАКТИВИ

- 5.1. n-хексан, или, ако няма такъв, лек петрол (точка на кипене 30 до 50 °C), с качество за хроматография.
- 5.2. 2-пропанол или етанол, 95 % (v/v), с качество за аналитичен реактив.
- 5.3. 2-пропанол, или етанол, воден разтвор 1/1.
- 5.4. Диетилов етер, свободен от пероксиди.
- 5.5. Ацетон.
- 5.6. Мравчена киселина, поне 98 % (m/m).
- 5.7. Проявителен разтворител: смес от n-хексан (5.1.), диетилов етер (5.4.) и мравчена киселина (5.6.) в съотношение 70/30/1 (v/v/v).
- 5.8. Активиран диалуминиев триоксид за хроматография, неутрален, степен по Брокман I.
- 5.9. Прахообразен силициев диоксид, със свързващо вещество, с качество, подходящо за тънкослойна хроматография.
- 5.10. Панкреатична липаза с подходящо качество (бележки 1 и 2).
- 5.11. Натриев хидроксид, воден разтвор в концентрация 120 g/l.
- 5.12. Солна киселина, 6 Mol/l воден разтвор.
- 5.13. Калциев хлорид (CaCl<sub>2</sub>), воден разтвор в концентрация 220 g/l.
- 5.14. Натриев холат (с ензимно качество), воден разтвор в концентрация 1 g/l.
- 5.15. Буферен разтвор: 1 M воден разтвор на трис-хидрокси метиламинометан доведен до рН 8 чрез добавяне на солна киселина (5.12.) (проверява се с потенциометър).
- 5.16. Фенолфталеин, разтвор в концентрация 10 g/l в 95 % (v/v) етанол.
- 5.17. 2',7'-дихлорофлуоресцин, разтвор в концентрация 2 g/l в 95 % (v/v) етанол, леко алкализирани чрез прибавянето на една капка 1 N разтвор на натриев хидроксид на 100 ml.

За контрол на активността на липазата:

- 5.18. Неутрализирано масло.
- 5.19. Натриев хидроксид, 0,1 M воден разтвор.
- 5.20. Натриев холат (с ензимно качество), воден разтвор в концентрация 200 g/l.
- 5.21. Гуми арабика, воден разтвор в концентрация 100 g/l.

## 6. ПОДГОТОВКА НА ПРОБАТА

Ако пробата е с киселинност под 3 %, определена съгласно приложение II, се пречиства директно върху диалуминиевия триоксид, съгласно 6.2.

Ако пробата е с киселинност над 3 %, определена съгласно приложение II, се неутрализира с основи в присъствието на разтворител, съгласно 6.1., след което се пасира върху диалуминиев триоксид, съгласно 6.2.

- 6.1. Неутрализиране чрез основи в присъствието на разтворител.

Около 10 g сурово масло се поставят в разделителна фуния (4.6.), добавят се 100 ml хексан (5.1.), 50 ml 2-пропанол (5.2.), няколко капки от развора на фенолфталеин (5.16.) и такова количество от развора на натриев хидроксид (5.11.), което съответства на свободната киселинност на маслото плюс добавка от 0,3 %. Разклаща се силно в продължение на една минута, добавят се 50 ml дестилирана вода, разклаща се отново и се оставя в покой за утаяване.

След разделянето долният слой от сапуни се отстранява. Всички междинни слоеве (слиз, неразтворима материя) също се отстраняват. Хексановият разтвор на неутрализирано масло се промива с последователни порции от 25 до 30 ml от развора на 2-пропанол (5.3.) до изчезването на розовия цвят на фенолфталеина.

Влагата се отстранява от хексана чрез дестилация под вакуум в ротационния изпарител (4.18.), маслото се изсушава при 30 до 40 °C под вакуум с помощта на поток от чист азот до пълното отстраняване на хексана.

#### 6.2. Пречистване през диалуминиев триоксид

Приготвя се суспензия от 15 g активиран диалуминиев триоксид (5.8.) в 50 ml хексан (5.1.) и се налива докато се разбърква върху хроматографската колонка (4.7.). Остава се диалуминиевият триоксид да се разпредели равномерно и се остава нивото на разтворителя да спадне до 1 до 2 mm над абсорбента. Внимателно се излива върху колоната разтвор на 5 g масло в 25 ml хексан (5.1.); цялата оттекла се от колонката течност се събира в колба с кръгло дъно (4.1.)

#### 7. ПОДГОТОВКА НА ХРОМАТОГРАФСКИТЕ ПЛАКИ

Старателно се почистват стъклениите плаки (4.13.) с етанол, лек петрол и ацетон за отстраняване на всякакви следи от мастни вещества.

В конична колба (4.4.) се поставят 30 g прахообразен силициев диоксид (5.9.). Прибавят се 60 ml дестилирана вода. Поставя се капачка и се разклаща енергично в продължение на една минута. Пренася се маслената суспензия в разпределителя (4.12.) и чистите плаки се обвиват в слой с дебелина 0,25 mm.

Изсушават се плаките на въздух за 15 минути, след това — за един час в пещ (4.16.) при  $103 \pm 2$  °C. Преди употреба плаките се охлаждат в десикатор до стайна температура.

В търговската мрежа се предлагат готови плаки.

#### 8. ХОД НА ОПИТА

##### 8.1. Хидролиза с панкреатична липаза.

В центрофужна епруветка (4.8.) се измерват около 0,1 g от подготвената проба, а ако пробата е от течно масло, се постъпва направо, както е описано по-долу.

Прибавят се 20 mg липаза (5.10.) и 2 ml от буферния разтвор (5.15.). Разклаща се добре, но внимателно, след което се прибавят 0,5 ml от развора на натриев холат (5.14.) и 0,2 ml от развора на калциев хлорид (5.13.). Епруветката се затваря с шлифованата запушалка, разклаща се внимателно (избягва се намокрянето на запушалката) и веднага се поставя в термостат (4.17.), настроен на  $40 \pm 0,5$  °C, и се разклаща ръчно в продължение на точно една минута.

Епруветката се изважда от термостата и се разбърква с помощта на електрически шутел-апарат (4.19.) в продължение на общо две минути.

Охлажда се моментално под течаща вода; прибавя се 1 ml солна киселина (5.12.) и 1 ml диетилов етер (5.4.). Затваря се и се разбърква енергично с помощта на електрически шутел-апарат. Остава се да престои и се отделя органичният слой чрез спринцовката (4.10.), ако е необходимо — след центрофугиране.

##### 8.2. Отделяне на моноглицеридите чрез тънкослойна хроматография.

Нанася се екстрактът върху хроматографската плака в микроспринцовката (4.11.) на около 1,5 cm от долния край на възможно най-тъсна и тънка равномерна линия. Поставя се плаката в добре наситената камера за проявяване (4.14.) и се проявява с проявителния разтворител (5.7.) при температура около 20 °C, до около 1 cm от горния край на плаката.

Плаката се изсушава на въздух при температурата на камерата и се опръсква с развора на 2',7'-дихлорофлуоресцин (5.17.). Ивицата на моноглицеридите се разпознава ( $R_f$  около 0,035) под ултравиолетова светлина (4.20.).

##### 8.3. Анализ на моноглицеридите чрез газово-течностна хроматография.

Отстранява се ивицата, получена в 8.2., с помощта на шпатула (избягва се отстраняването на съставки, останали на стартовата линия) и се пренася в колбата за метилиране (4.2.).

Събраният силикагел се обработва директно по методите, описани в приложение XB, така че моноглицеридите да се превърнат в метилови естери, след което естерите се подлагат на газова хроматография, както е описано в приложение XA.

#### 9. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Изчислява се съставът на масните киселини на второ място до една цифра след десетичната запетая (бележка 3).

## 10. БЕЛЕЖКИ

## Бележка 1: Проверяване на активността на липазата

Приготвя се маслена емулсия чрез разклащането на смес от 165 ml от разтвора на гуми арабика (5.21.), 15 g натрошен лед и 20 ml неутрализирано масло (5.18.) с подходяща бъркалка.

В мензура (4.5.) се поставят 10 ml от тази емулсия, като след това се добавят 0,3 ml от разтвора на натриев холат (5.20.) и 20 ml дестилирана вода.

Поставя се мензурата в термостат, нагласен да поддържа  $37 \pm 0,5$  °C (бележка 4); потапят се електродите на рН-метър (4.21.) и спираловидна бъркалка (4.22.).

С помощта на бюрета (4.23.) се прибавя на капки разтвора на натриев хидроксид (5.19.) докато рН достигне 8,5.

Прибавя се достатъчно от водната суспензия на липазата (виж по-долу). Веднага щом рН-метърът покаже рН 8,3, се включва секундомерът (4.24.) и се накапва разтвора на натриев хидроксид (5.19.) в такова количество, че да се поддържа рН от 8,3. Отчита се обемът на основния разтвор, който се подава всяка минута.

Наблюденията се записват под формата на графика, като времевите показания се използват за абсциса, а милилитрите от основния разтвор, които са нужни за поддържането на постоянно рН, като ордината. Следва да се получи линейна графика.

Гореспомнатата суспензия на липаза е едно на хиляда (m/m) суспензия във вода. За всеки опит трябва да се използва достатъчно от тази суспензия, така че около 1 ml от основния разтвор да се добавя на четири до пет минути. Обикновено са нужни около 1 до 5 mg от праха.

Липазната единица се дефинира като количеството от ензима, което освобождава 10 микроеквивалента киселина за минута. Тогава активността А на използвания прах, измерен в липазни единици за mg, е представен чрез формулата:

$$A = \frac{V \times 10}{m}$$

където V е обемът от използвания за минута разтвор на натриев хидроксид (5.19.), изчислен от графиката, m е масата в mg, на частта от праха, използвана при опита.

## Бележка 2: Приготвяне на липазата

Липази, притежаващи задоволителна липазна активност, се предлагат в търговската мрежа. Но също така е възможно те да се приготвят в лабораторията, както следва:

Охлаждат се 5 kg свински панкреас до 0 °C, премахва се околната твърда мазнина и съединителна тъкан и се смилва фино в миксер до получаването на пастообразна течност. Размесва се сместа с бъркалката (4.25.) за четири до шест часа с 2,5 l безводен ацетон и се центрофугира. Екстрахира се утайката още три пъти със същото количество ацетон, след това два пъти със смес от равни части (V/V) ацетон и диетилов етер и два пъти с диетилов етер.

Изушава се остатъкът под вакуум за 48 часа до получаването на стабилен прах, който трябва да се съхранява в хладилник.

## Бележка 3: Във всеки случай е препоръчително да се определи съставът на общото количество мастни киселини на същата проба, тъй като сравнението с това на киселините на второ място ще помогне за интерпретирането на получените цифри.

## Бележка 4: Температурата за хидролизирание се поддържа 37 °C, когато се използва течно масло. За да се позволи изследването на масла, чиято точка на топене е до 45 °C обаче, тя се поддържа 40 °C за опитните проби.

## ПРИЛОЖЕНИЕ VIII

## ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА ТРИЛИНОЛЕИНА

## 1. ОБХВАТ

Определянето на състава на триглицерида в маслиновото масло по отношение на еквивалентното въглеродно число чрез високоефективна течностна хроматография.

Настоящият метод описва метод за фракциониране и количествено определяне на състава на триглицериди в растителните масла по отношение на тяхната молекулна маса и степен на насищане, като функция на тяхното еквивалентно въглеродно число (виж бележка 1).

## 2. ПРИЛОЖНО ПОЛЕ

Методът е приложим за всички растителни масла, съдържащи триглицериди на дълговерижни мастни киселини. Методът е особено приложим за доказването на наличие на малки количества от полусъхнети масла (богати на линолова киселина) в растителните масла, съдържащи олеинова киселина като преобладаваща ненаситена мастна киселина, като маслиновото масло.

## 3. ПРИНЦИП

Фракционирането на триглицеридите в съответствие с тяхното еквивалентно въглеродно число чрез високоефективна течностна хроматография (обратна фазова полярност) и интерпретирането на хроматограмите.

## 4. АПАРАТУРА

- 4.1. Високоефективен течностен хроматограф, позволяващ термостатичен контрол на температурата на колонката.
- 4.2. Апарат за инжектиране с възможност за 10  $\mu$ l.
- 4.3. Детектор: диференциален рефрактометър. Цялостната чувствителност трябва да е поне  $10^{-4}$  от рефракционния индекс.
- 4.4. Колонка: тръба от неръждаема стомана с дължина 250 mm и вътрешен диаметър 4,5 mm, обвита с частици силициев диоксид с размери 5  $\mu$ m с 22 до 23 % въглерод под формата на октадецилсилан (бележка 2).
- 4.5. Записващо устройство и/или интегратор.

## 5. РЕАКТИВИ

Реактивите трябва да са с чистота за аналитични цели. Разтворителите за отмиване трябва да бъдат дегазирани и да могат да се рециклират неколккратно, без да това да оказва ефект върху фракциониранията.

- 5.1. Хлороформ.
- 5.2. Ацетон.
- 5.3. Ацетонитрил.
- 5.4. Разтворител за отмиване: ацетонитрил + ацетон (пропорциите се нагласяват за получаването на желаните фракционирания; започва се със смес в съотношение 50:50).
- 5.5. Солубилизиращ разтворител: ацетон или смес от равни части ацетон и хлороформ.
- 5.6. Стандартни триглицериди: могат да се използват или триглицериди от търговската мрежа (трипалмитин, триолеин и тъй нататък) и оттам времената за задържане да се нанесат на графика, в съответствие с еквивалентното въглеродно число, или като алтернатива да се получи стандартна хроматограма на соево масло (виж бележки 3 и 4 и фигури 1 и 2).

## 6. ПОДГОТОВКА НА ПРОБИТЕ

5 % разтвор от пробите за анализ се приготвя чрез претеглянето на  $0,5 \pm 0,001$  g от пробата в 10-милилитрова градуирана колба и доливането до 10 ml със солубилизиращия разтворител (5.5.).

## 7. ХОД НА ОПИТА

- 7.1. Наглася се системата за хроматография. Изпомпва се отмиващият разтворител (5.4.) с дебит от 1,5 ml/mm за продухване на цялата система. Изчаква се получаването на стабилна базова линия.

Инжектират се 10 µl от пробата, приготвена съгласно 6.

## 8. ИЗЧИСЛЕНИЕ И ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Използва се методът за вътрешна стандартизация, т.е. счита се, че сборът от лицата на пиковите, съответстващи на различните триглицериди, е равен на 100 %. Изчислява се относителното процентно съдържание на всеки триглицерид, като се използва формулата:

$$\% \text{ на триглицерида} = \frac{\text{лицето на пика}}{\text{сбора от лицата на пиковите}} \times 100.$$

Резултатът се изчислява до една цифра след десетичната запетая.

*Бележка 1.* Редът на отмиване може да се определи чрез изчисляването на еквивалентните въглеродни числа, често определяни като зависимостта  $EVЧ = VЧ - 2n$ , където  $VЧ$  е въглеродното число, а  $n$  е броят на двойните връзки; то може да се изчисли много по-прецизно, като се вземе предвид произходът на двойната връзка. Ако  $n_0$ ,  $n_1$  и  $n_{1n}$  са броят на двойните връзки, характерни съответно за олеиновата, линоловата и линоленовата киселина, еквивалентното въглеродно число може да се изчисли чрез зависимостта във формулата:

$$EVЧ = VЧ - d_0 n_0 - d_1 n_1 - d_{1n} n_{1n},$$

където коефициентите  $d_0$ ,  $d_1$  и  $d_{1n}$  могат да се изчислят чрез стандартните триглицериди. Съгласно условията, посочени в настоящия метод, получената зависимост ще е близка до:

$$EVЧ = VЧ - [2,60 n_0] - [2,35 n_1] - [2,17 n_{1n}]$$

*Бележка 2.* Примери: Лихросорб (Merck) RP18 Art 50333;

Лихросфер или еквивалент (Merck) 100 CN18 Art 50377.

*Бележка 3.* С няколко стандартни триглицерида също е възможно да се изчисли равенството по отношение на триолеина,

$$\alpha = VЗ' / VЗ'_{\text{олеин}}$$

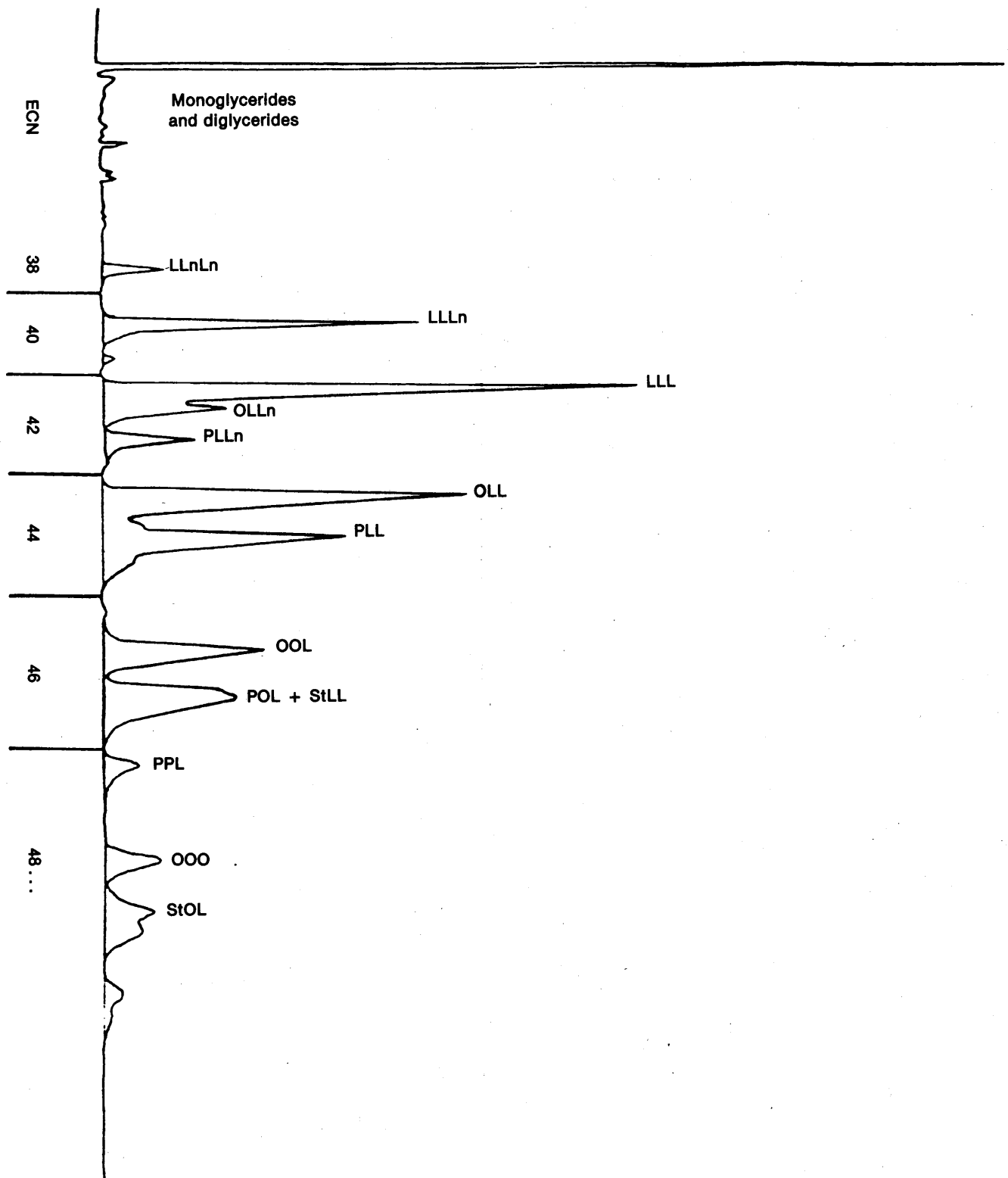
чрез използването на намалено време за задържане  $VЗ' = VЗ - VЗ_{\text{разтворител}}$ .

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 — виж фигура 2.

*Бележка 4.* Ефикасността на колонката трябва да позволява ясното отделяне на пика на трилинолеина от пиковите на триглицеридите с близко  $VЗ$ .

Фигура 1

Хроматограма на проба от соево масло



P = палмитинова киселина

St = стеаринова киселина

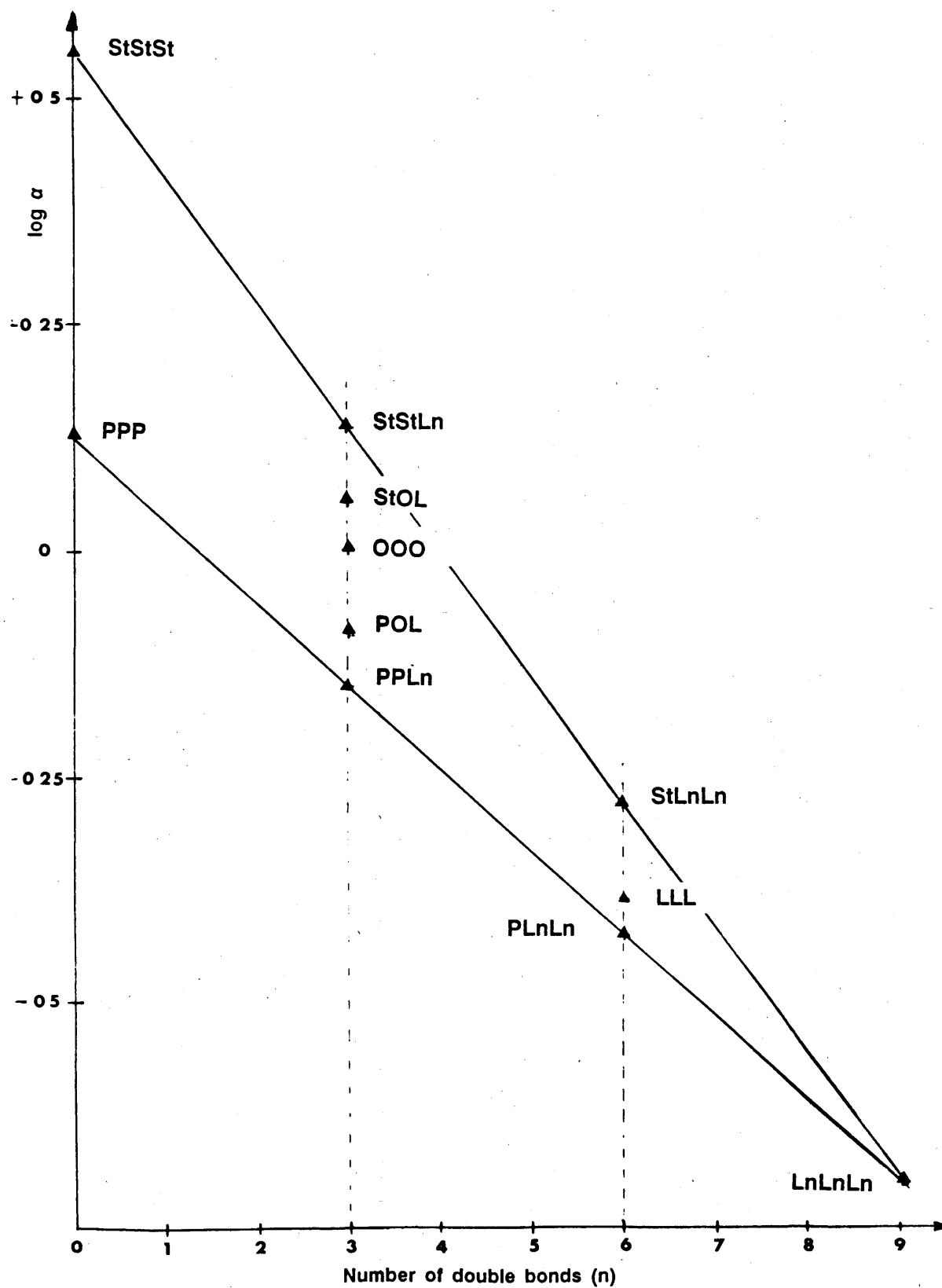
O = олеинова киселина

L = линолова киселина

Ln = линоленова киселина



Фигура 2

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

La = лауринова киселина  
 St = стеаринова киселина  
 Ln = линоленова киселина

Mu = миристинова киселина  
 O = олеинова киселина

P = палмитинова киселина  
 L = линолова киселина

## ПРИЛОЖЕНИЕ IX

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ В УЛТРАВИОЛЕТОВИЯ СПЕКТЪР

## ПРЕДИСЛОВИЕ

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

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

## 1. ОБХВАТ

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

## 2. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

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

## 3. ОБОРУДВАНЕ

- 3.1. Спектрофотометър за измерване на екстинкцията в ултравиолетовия спектър между 220 и 360 nm, с възможност за отчитане на отделните нанометрични единици.
- 3.2. Правоъгълни кварцови кювети с капачки, имащи оптична дължина 1 cm. Когато се изпълнят с вода или друг подходящ разтворител, кюветите не трябва да показват помежду си разлики по-големи от 0,01 екстинкционни единици.
- 3.3. 25-милилитрови градуирани колби.
- 3.4. Хроматографска колонка с дължина 450 mm и диаметър 35 mm с разрядна тръба с диаметър приблизително 10 mm.

## 4. РЕАКТИВИ

- 4.1. Изооктан (2,2,4-триметилпентан), пречистен за спектрофотометричен анализ. Срещу дестилирана вода той трябва да има пропускливост от не по-малко от 60 % при дължина на вълната 220 nm и не по-малко от 95 % — при 250 nm или
  - циклохексан, пречистен за спектрофотометричен анализ: срещу дестилираната вода той трябва да има пропускливост не по-малко от 40 % при 220 nm и не по-малко от 95 % — при 250 nm, или
  - друг подходящ разтворител, който има свойството напълно да разтваря мазнината (напр. етилов алкохол за рициновото масло).
- 4.2. Основен диалуминиев триоксид за колонкова хроматография, приготвен и изпитан, както е описано в приложение I.
- 4.3. n-хексан, за хроматография.

## 5. ХОД НА ОПИТА

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

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

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

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

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

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

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

## 6. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

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

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

където:

$K_{\lambda}$  = специфичната екстинкция при дължина на вълната  $\lambda$ ;

$E_{\lambda}$  = екстинкцията, измерена при дължина на вълната  $\lambda$ ;

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

$s$  = дебелина на кюветата, в cm.

Резултатите се изразяват до две цифри след десетичната запетая.

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

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

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

## ДОПЪЛНЕНИЕ I

*Приготвяне на диалуминиевия триоксид и изпитване на неговата активност*

## A.1.1. Приготвяне на диалуминиевия триоксид

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

## A.1.2. Проверка на активността на диалуминиевия триоксид

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

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

през колонката.

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

---

## ДОПЪЛНЕНИЕ II

*Калибриране на спектрофотометъра*

- A.2. Оборудването трябва да се проверява на периоди (поне на всеки шест месеца) както за отговор към дължината на вълната, така и за точността на отговор.
- A.2.1. Дължината на вълната може да се провери при използването на живачна лампа или с помощта на подходящи филтри.
- A.2.2. С оглед на проверката на отговора на фотоклетката и фотоумножителя се постъпва по следния начин: претеглят се 0,2000 g чист калиев хромат за спектрофотометрия и се разтваря в 0,05 N разтвор на калиев хидроксид в 1000 ml градуирана колба като се долива до резката. Вземат се точно 25 ml от получения разтвор, пренасят се в 500 ml градуирана колба и се разреждат до резката като се използва същият разтвор на калиев хидроксид.
- Измерва се екстинкцията на така получения разтвор при 275 nm, като се използва разтвор на калиев хидроксид като стандарт. Измерената екстинкция при използването на 1 cm кювета трябва да е  $0,200 \pm 0,005$ .
-

## ПРИЛОЖЕНИЕ X А

## ГАЗОВОХРОМАТОГРАФСКИ АНАЛИЗ НА МЕТИЛОВИТЕ ЕСТЕРИ НА МАСТНИТЕ КИСЕЛИНИ

## 1. ОБХВАТ

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

Методът не е приложим за полимеризирани мастни киселини.

## 2. РЕАКТИВИ

## 2.1. Газ носител

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

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

## 2.2. Спомагателни газове

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

2.2.2. Въздух или кислород, свободен от органични примеси.

## 2.3. Референтен стандарт

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

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

## 3. АПАРАТУРА

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

## 3.1. Газов хроматограф

Газовият хроматограф се състои от следните елементи.

## 3.1.1. Система за инжектиране

Използва се система за инжектиране или:

- а) със запълни колонки, имащи възможно най-малкото мъртво пространство (в този случай системата за инжектиране трябва да може да се нагрява до температура с 20 до 50 °C по-висока от тази на колонката); или
- б) с капилярни колонки, като в този случай системата за инжектиране да е специално проектирана за използване с такива колонки. Тя може да е от разделителен тип или може да е от типа без разделяне на колонковия инжектор.

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

## 3.1.2. Пещ

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

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

- a) дължина: 1 до 3 m. Когато има наличие на дълговерижни мастни киселини (над C<sub>20</sub>), следва да се използва относително къса колонка. Когато се анализират киселини с 4 до 6 въглеродни атома, се препоръчва да се използва колонка с дължина 2 m.
- b) вътрешен диаметър: 2 до 4 mm.

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

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

3.1.3.2. Пълнеж, състоящ се от следните елементи:

- a) *абсорбент*: промита с киселина и силанизирана инфузорна пръст или друг подходящ инертен абсорбент с тесни разлики в размера на частиците (25 µm разлика в частиците в границите от 125 до 200 µm), като средният размер на частиците се определя от вътрешния диаметър и дължината на колонката;
- b) *неподвижна фаза*: полярна течност от полиестерен тип (напр. диетиленгликолов сукцинат, бутандиолов полисукцинат, етиленгликолов полиадипат и т.н.), цианосиликони или друга течност, позволяваща изискваното хроматографско фракциониране (виж клауза 4). Неподвижната фаза трябва да възлиза на 5 до 20 % (m/m) от пълнежа. За определени фракционирания може да се използва неполярна неподвижна фаза.

3.1.3.3. Кондициониране на колонката

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

3.1.4. Капилярна колонка

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

3.1.4.2. Неподвижна фаза, обикновено от типа полигликол (поли(етилен гликол) 20000), полиестер (бутандиолов полисукцинат) или полярен полисилоксан (цианосиликони). Подходящи са и свързаните (напречносвързани) колонки.

Бележка 5: Съществува риск полярните полисилоксани да създадат трудности при разпознаването и фракционирането на линоленовата киселина и C<sub>20</sub> киселините.

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

3.1.4.3. Сглобяване и кондициониране на колонката

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

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

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

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

### 3.2. Спринцовка

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

### 3.3. Записващо устройство

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

- a) коефициент на отговор под 1,5 sec за предпочитане 1 sec (коефициентът на отговор е времето, необходимо на писеца на записващото устройство да премине от 0 до 90 % след внезапното въвеждане на сигнал от 100 %;

- б) ширина на хартията минимум 20 cm;
- в) скорост на подаване на хартията, която може да се настройва между 0,4 и 2,5, cm/min.

#### 3.4. **Интегратор**

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

#### 4. **ХОД НА ОПИТА**

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

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

##### 4.1. **Условия на опита**

###### 4.1.1. Избор на оптимални условия на работа

###### 4.1.1.1. Запълнена колонка

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

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

Най-общо стойностите, представени в таблица 1 и таблица 2, водят до желаните резултати, т.е. поне 2000 теоретични плаки за метър дължина на колонката за метилов стеарат и неговото отмиване в рамките на 15 минути.

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

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

Таблица 1

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

Таблица 2

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



## 4.1.1.2. Капилярна колонка

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

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

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

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

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

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

и разделителната способност  $R$ , с помощта на формулата:

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

където:

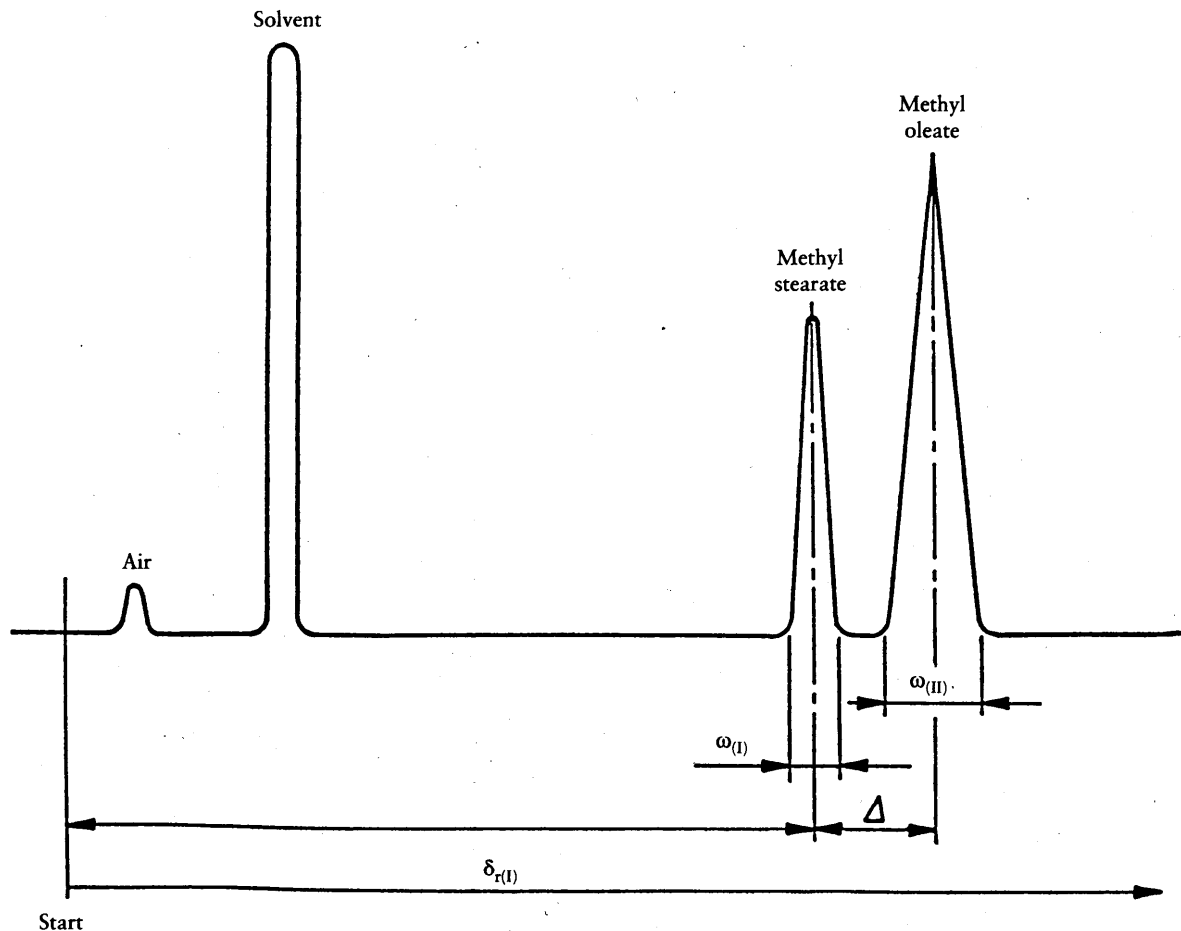
$dr_1$  е разстоянието на задържане, в милиметри, от началото на хроматограмата до максимума на пика на метиловия стеарат;

$\omega_1$  и  $\omega_2$  са съответно ширините, в милиметри, на пиковете на метиловия стеарат и метиловия олеат, измерени между точките на пресичане на тангентите при точките на извиване на кривата с основната линия;

$\Delta$  е разстоянието, в милиметри, между максималната стойност на върха на метиловия стеарат и метиловия олеат.

Фигура 1

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



Условията на работа, които ще бъдат избрани, трябва да позволяват поне 2000 теоретични плаки за метър от дължината на колонката за метилов стеарат и разделителна способност от поне 1,25.

#### 4.2. Размер на пробата

С помощта на спринцовката (3.2.) се изтеглят 0,1 до 2  $\mu\text{l}$  от разтвора на метиловите естери, приготвен съгласно приложение X Б, и се инжектират в колонката.

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

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

#### 4.3. Анализ

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

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

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

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

#### 4.4. Изготвяне на референтната хроматограма и на референтните графики

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

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

#### 5. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

##### 5.1. Качествен анализ

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

##### 5.2. Количествен анализ

###### 5.2.1. Определяне на състава

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

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

###### 5.2.2. Метод за изчисляване

###### 5.2.2.1. Общ случай

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

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

където:

$A_i$  е лицето под пика, съответстващ на компонента  $i$ ;

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

Резултатът се изчислява до една цифра след десетичната запетая.

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

###### 5.2.2.2. Използване на фактори за корекция

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

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

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

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

където:

$m_i$  е масата на компонента  $i$  в стандартната смес;

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

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

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

където:

$A_i$  е лицето под пика, съответстващ на компонента  $i$ ;

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

Тогава факторът за корекция се изчислява като:

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

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

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

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

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

Резултатите се представят до една цифра след десетичната запетая.

#### 5.2.2.3. Използване на вътрешен стандарт

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

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

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

където:

$A_i$  е лицето под пика, съответстващ на компонента  $i$ ;

$A_s$  е лицето под пика, съответстващ на вътрешния стандарт;

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

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

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

$m_s$  е масата, в милиграми, на вътрешния стандарт.

Резултатът се представя до една цифра след десетичната запетая.

#### 6. СПЕЦИАЛЕН СЛУЧАЙ — ИЗПОЛЗВАНЕ НА КАТАРОМЕТРИЧЕН ДЕТЕКТОР (РАБОТЕЩ НА ПРИНЦИПА НА ПРОМЕНИТЕ В ТОПЛИННАТА ПРОВОДИМОСТ)

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

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

Таблица 3

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

## 7. ДОКЛАД ЗА ОПИТА

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

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

## ПРИЛОЖЕНИЕ X Б

**ПОЛУЧАВАНЕ НА МЕТИЛОВИ ЕСТЕРИ НА МАСТНИ КИСЕЛИНИ В СЪОТВЕТСТВИЕ С ДЯЛОВЕ I И II ОТ ПРИЛОЖЕНИЕ VI КЪМ РЕГЛАМЕНТ (ЕИО) № 72/77 ИЛИ ПО МЕТОДА, ОПИСАН ПО-ДОЛУ****ПРЕДВАРИТЕЛНИ БЕЛЕЖКИ**

Изборът на производствен процес е продиктуван от киселинния състав, киселинността на разглежданото мастно вещество и подлежащия на провеждане газов хроматографски анализ.

По-специално:

- за мастни вещества, които съдържат мастни киселини с по-малко от 12 въглеродни атома, се използват единствено процеси, протичащи в херметични съдове или използващи диметил сулфат;
- за мастни вещества с киселинност над 3 % могат да се използват единствено процеси с метанол-солна киселина или метил сулфат;
- за газово-хроматографски измервания на трансизомерите могат да се използват единствено процеси с употреба на натриев метилат или диметил сулфат;
- за получаването на метил естери от малки количества мастни вещества, на свой ред получени от разделяне посредством тънкослойна хроматография, трябва да се използва процесът метанол-хексан-сярна киселина.

Наличието на неосапуняемост може да не се взема под внимание, ако не надвишава 3 %, в противен случай метил естерите ще трябва да се приготвят от мастни киселини.

**1. ОБХВАТ И ПРИЛОЖНО ПОЛЕ**

Далено е описание на пет процеса за получаването на метил естери от мастни вещества:

- а) с помощта на натриев метилат;
- б) с помощта на натриев метилат в херметичен съд;
- в) с метанол-солна киселина в херметичен съд;
- г) с диметил сулфат;
- д) с метанол-хексан-сярна киселина.

**Процес А****2. ПРИНЦИП НА ДЕЙСТВИЕ**

Подложеното на анализ мастно вещество се загрява с обратен хладник с метилов алкохол и натриев метилат. Получените метил естери се извличат с помощта на етилов етер.

**3. АПАРАТУРА**

- 3.1. 100-милилитрова колба с обратен хладник и варовикова тръбичка, прикрепена в горната ѝ част, със снапки от шлифовано стъкло.
- 3.2. 50-милилитрова мерителни чаши.
- 3.3. 5-милилитрова мерителна пипета, маркирана през 0,1 ml.
- 3.4. 250-милилитрова разделителни фунии.
- 3.5. 200-милилитрова колба.

**4. РЕАКТИВИ**

- 4.1. Безводен метанол.

- 4.2. Приблизително еднопроцентов метанолов разтвор на натриев метилат; той се получава от разтварянето на 0,34 g от метализиран натрий в 100 ml безводен метанол.
- 4.3. Етилов етер.
- 4.4. 10 % разтвор на натриев хлорид.
- 4.5. Петролен етер, загрят между 40 и 60 °C.
5. **ХОД НА ОПИТА**
  - 5.1. В 100-милилитрова колба се поставят 2 g от масното вещество, което е било предварително обезводнено на натриев сулфат и филтрирано. Добавят се 35 ml метанол, поставя се кондензаторът и се загрява с обратен хладник до кипене в продължение на няколко минути.
  - 5.2. Прекратява се процесът на загряване, отстранява се кондензаторът и бързо се прибавят 3,5 ml от разтвора на натриев метилат; отново се поставя хладникът и се нагрява до кипене с хладника в продължение на поне 3 часа. Метилирането е настъпило, когато цялото масно вещество се е втечило, а сместа от реактивите е напълно прозрачна при стайна температура.
  - 5.3. Охлажда се и сместа от реактивите се прелива в 250-милилитрова разделителна фуния, добавят се между 35 и 40 ml етилов етер, 100 ml вода и 4 до 5 ml от 10-процентовия разтвор на натриев хлорид. Разклаща се и се оставят слоевете да се разделят. Прехвърля се водната фаза във втора разделителна фуния и се извършва повторно извличане с помощта на 25 ml етилов етер.  
  
Добавят се 50 ml петролен етер, загрят до температура между 40 и 60 °C към смесените етерни екстракти. Отделя се вода, която може да бъде отстранена.  
  
Промива се етерната фаза с 10 до 15 ml вода, изсушава се върху натриев сулфат и се филтрира през хартия, като филтратът се събира в 200-милилитрова колба.  
  
Разтворът се изпарява до обем от 20 ml, като процесът се извършва на водна баня под струя от чист азот.

### Процес Б

2. **ПРИНЦИП**

Подложеното на анализ масно вещество се третира с натриев метилат в метанолов разтвор в херметичен съд при 85 до 90 °C.
3. **АПАРАТУРА**
  - 3.1. Усилен стъклен херметичен съд с вместимост от около 5 ml (височина 40 до 45 mm, диаметър 14 до 16 mm).
  - 3.2. 1-милилитрова мерителна пипета, на която е отбелязано съдържание от 0,1 ml.
4. **РЕАКТИВИ**
  - 4.1. Приблизително 1,5-процентов метанолов разтвор на натриев метилат. Той се получава като се разтвори 0,50 g от метализиран натрий в 100 ml безводен метанол.
5. **ХОД НА ОПИТА**
  - 5.1. Поставят се 2 g от масното вещество, което предварително е било обезводнено на натриев сулфат и филтрирано, в стъкления съд. Прибавят се 0,3 g (около 0,4 ml) от разтвора на натриев метилат. Херметизирате съда чрез загряване.
  - 5.2. Потопява се съда за 2 часа при температура между 85 и 90 °C, като от време на време се разклаща. Процесът на естерификация е завършил, когато съдържанието на съда е прозрачно, след отлагането на глицерина и остатъка от реагиращите вещества.
  - 5.3. Охлажда се при стайна температура. Съдът се отваря, когато предстои използването на метиловите естери. Те не се нуждаят от допълнително третиране преди поставянето им в газовохроматографския апарат.

### Процес В

2. **ПРИНЦИП**

Масното вещество, подложено на анализ, се третира с метанол-солна киселина, в херметичен съд, при температура 100 °C.

### 3. АПАРАТУРА

- 3.1. Усилен стъклен херметичен съд с вместимост от около 5 ml (височина 40 до 45 mm, диаметър 14 до 16 mm).
- 3.2. Калибровани пипети от 1 и 2 ml.

### 4. РЕАКТИВИ

- 4.1. Разтвор на солна киселина в 2 % метанол. Той се получава от газообразна солна киселина и безводен метанол (бележка 1).
- 4.2. Хексан за газова хроматография.

### 5. ХОД НА ОПИТА

- 5.1. Поставят се 0,2 g от масното вещество, което предварително е било обезводнено на натриев сулфат и филтрирано, в стъкления съд и 2 ml от разтвора на солната киселина и метанола. Херметизирате съда чрез загряване.
- 5.2. Потапя се съда при 100 °C за 40 минути.
- 5.3. Охлажда се съда под течаша вода, отваря се, добавят се 2 ml дестилирана вода и 1 ml хексан. Центрофугира се и се отстранява хексановата фаза, която е готова за използване.

## Процес Г

### 2. ПРИНЦИП

Масното вещество, което е подложено на анализ, се осапунява с разтвор на калиева основа в метилов алкохол, след което се третира с диметил сулфат. При добавяне на солна киселина се разделят автоматично образуваните метилови естери. При допълнително третиране с диалуминиев триоксид се получават много чисти метилни естери.

### 3. АПАРАТУРА

- 3.1. Усилена епруветка с вместимост от около 20 ml със запушалка от матово стъкло с размери 10/19 и безопасителни шипки.
- 3.2. Обратни хладници, със снадки от шлифовано стъкло с размери 10/19.
- 3.3. Стъклени филтри със синтерован диск, размер G2, диаметър 20 mm.
- 3.4. Стъклени епруветки с вместимост от приблизително 10 ml и конично дъно.
- 3.5. Спринцовки от 1 и 5 ml.

### 4. РЕАКТИВИ

- 4.1. Калиев хидроксид, 10-процентов разтвор в метилов алкохол, за газова хроматография.
- 4.2. Индикатор зелен бромкрезол: 0,05 % разтвор в метилов алкохол.
- 4.3. Диметил сулфат ( $\rho = 1,335$  при 15 °C).
- 4.4. Концентрирана солна киселина ( $\rho = 1,19$ ), разрежена в равни части с метилов алкохол, за газова хроматография.
- 4.5. Алюминиев оксид по Брокман за адсорбционна хроматография.

### 5. ХОД НА ОПИТА

- 5.1. Поставят се 2,2 ml от масното вещество, което е било предварително обезводнено на натриев сулфат и филтрирано, в 20-милилитрова епруветка. Прибавят се 5 ml от разтвора на калиевия хидроксид и няколко кварцови гранули за контролиране на кипенето. Поставя се обратният хладник и се загрява на слаб пламък за около пет минути, като се разклаща. Осапуняването е завършило, когато разтворът стане прозрачен. Накрая се охлажда под течаша вода и се отстранява хладникът.



5.2. Добавят се две капки от индикатора и като се използва спринцовка — 1 ml диметил сулфат — бавно. Епруветката се затваря херметически и се разклаща в продължение на две-три минути, като дъното на епруветката се потапя в кипяща водна баня през чести интервали. Реакцията е завършила, когато индикаторът промени цвета си от син в жълт. Накрая се охлажда епруветката под течаща вода, отваря се я и се прибавят 5 ml от метаноловия разтвор на солна киселина.

5.3. След като се разклати за няколко секунди, епруветката се поставя под ъгъл и се потупва леко. Това улеснява изкачването на метиловите естери на повърхността под формата на мастна маса (бележка А).

Отстраняват се метиловите естери със спринцовка, поставят се в епруветка с конично дъно, добавя се диалуминиев триоксид, равняващ се на приблизително една четвърт от обема на метиловите естери, разклаща се и се филтрира през филтърна хартия.

*Бележка А.* Ако метиловите естери не се отделят сами, добавят се 5 ml вода в епруветката и се разклаща.

## Процес Д

### 2. ПРИНЦИП

Подложеното на анализ мастно вещество се загрява с обратен хладник с метанол-хексан-сярна киселина. Получените метилови естери се извличат с петролен етер.

### 3. АПАРАТУРА

- 3.1. Епруветка с вместимост от около 20 ml, снабдена с обратен хладник с дължина от около 1 m, със снадки от шлифовано стъкло.
- 3.2. 5-милилитрова калибрована пипета.
- 3.3. 50-милилитрова разделителна фуния.
- 3.4. Измерителни чаши от 10 и 25 ml.
- 3.5. 15-милилитрова епруветка с конично дъно.

### 4. РЕАКТИВИ

- 4.1. Реактив за метилиране: безводна смес от метанол-хексан-концентрирана сярна киселина ( $\rho = 1,84$ ) в пропорция 75:25:1 (V/V/V).
- 4.2. Петролен етер с температура между 40 и 60 °C.
- 4.3. Безводен натриев сулфат.

### 5. ХОД НА ОПИТА

- 5.1. Поставя се веществото от плаката в 20-милилитрова епруветка и се прибавят 5 ml реактив за метилиране.
- 5.2. Поставя се обратният хладник и се загрява в продължение на 30 минути на кипяща водна баня (бележка 2).
- 5.3. Сместа се прехвърля количествено в 50-милилитрова разделителна фуния с помощта на 10 ml дестилирана вода и 10 ml петролен етер. Разклаща се силно и се изчакава фазите да се разпелят, отстранява се водната фаза и етерната фаза се промива с 20 ml дестилирана вода. В разделителната фуния се добавя малко количество безводен натриев сулфат, разклаща се, изчакава се да се утаи в продължение на няколко минути и се филтрира, като филтратът се събира в 15-милилитрова епруветка с конично дъно.

Изпарява се разтворителят на водна баня под азотен поток.

*Бележка 1.* Малки количества газообразна солна киселина се приготвят лесно в лабораторни условия, като за целта се използва търговския разтвор ( $\rho = 1,18$ ), върху който се накапва концентрирана сярна киселина ( $\rho = 1,84$ ). Освободеният газ лесно се обезводнява чрез барботиране през концентрирана сярна киселина. Понеже солната киселина много бързо се абсорбира от метанола, препоръчително е да се вземат обичайните предпазни мерки при разварянето ѝ, като например газът се вкарва посредством малка обратна фуния, чийто ръб докосва повърхността на течността. Големи количества метанолов разтвор на солна киселина могат да се приготвят предварително, тъй като се съхранява отлично на тъмно в бутилки със стъклени запушалки.

*Бележка 2.* За контролиране точката на кипене, се поставя стъклена пръчка в епруветката, а температурата на водната баня се ограничава до 90 °C.

## 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 инфузозна 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. Постава се в термостат при 70 °C за един час. Като се използва спринцовка, внимателно се отнемат 0,2 до 0,5 ml от височинния обем. Инжектира се в колонката на газовия хроматографски апарат, настроен както следва:

- температура на инжектора: 150 °C;
- температура на колонката: 70 до 80 °C;
- температура на детектора: 200 до 250 °C.

Могат да се използват и други температурни стойности, стига резултатът да остане еквивалентен.

- 4.2. Референтни разтвори: подготвят се стандартни разтвори като се използва рафинирано маслиново масло без следи от разтворители с концентрации от 0,05 до 1 ppm (mg/kg), които да съответстват на предполагаемото съдържание на пробата. Халогенираните разтворители могат да се разреждат с пентан.
- 4.3. Количествено измерване: изчислява се съотношението между повърхностите или покачванията на пиковите на пробата и стандартния разтвор с предполагаема най-близка концентрация. Ако отклонението е по-голямо от 10 %, анализът трябва да се повтори, като се проведе сравнение с друг стандартен разтвор, докато отклонението се сведе в рамките на 10 %. Съдържанието се определя въз основа на средната стойност от отделните инжектирания.
- 4.4. Изразяване на резултатите: в ppm (mg/kg). Границата на разпознаване по този метод е 0,01 mg/kg.

## ПРИЛОЖЕНИЕ XII

## ОРГАНОЛЕПТИЧЕН АНАЛИЗ НА МАСЛИНОВОТО МАСЛО

## 1. ОБХВАТ

Целта на този метод е да се определят критериите, необходими за преценка на вкусовите качества на маслиновото масло от остатъчен материал, и да се разработи необходимата за целта методология.

## 2. ПРИЛОЖНО ПОЛЕ

Описаният метод е приложим единствено за целите на органолептичния анализ и класификация на маслиновото масло от остатъчен материал, който може да се използва за пряка консумация. Той се свежда до оценяване на маслиновото масло от остатъчен материал съгласно цифрова скала, свързана с възприемането на вкусовите дразнители според оценката на подобрени дегустатори, които работят в група.

## 3. ОБЩ ОСНОВЕН РЕЧНИК ЗА СЕТИВЕН АНАЛИЗ

Виж главата, озаглавена „Сетивен анализ: общ основен речник“.

## 4. РЕЧНИК, ОТНАСЯЩ СЕ ДО МАСЛИНОВОТО МАСЛО

*Бадел:* Вкусът се проявява в две форми: типичния за пресните бадеми или пък за изсушените, твърди бадеми, който може да бъде объркан с начална гранивост. Отличителният вкус се усеща след вкусане, докато маслиновото масло е все още в контакт с езика и небцето. Асоциира се със сладките масла, които имат блудкав вкус.

*Ябълка:* вкус на маслиновото масло, който напомня за вкуса на този плод.

*Мухлясало:* вкус на маслиновото масло, получен от маслини, складирани на купчини, достигнали напреднал стадий на ферментация.

*Горчиво:* характерен вкус на маслиновото масло, получавано от зелени маслини или маслини, които са започнали да променят цвета си. В зависимост от интензитета, може да е приятно или не толкова.

*Салатура:* Вкус на маслиново масло, извлечено от маслини, които са държани в солен разтвор.

*Креставица:* вкус, получен, когато маслиновото масло е било пакетирано херметически прекалено дълго, най-вече в тенекени кутии и който се дължи на образуването на 2,6-нонадиенал.

*С мирис на почва:* характерен вкус на маслиновото масло, получено от маслини, които са били събрани кални или покрити с почва, без да бъдат измити. Вкусът може да е съпътстван и с мирис на плесен или влага.

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

*Блудкав или безвкусен:* вкус на маслиново масло, чиито органолептични характеристики са твърде слаби поради загубата на ароматичните им компоненти.

*С вкус на плодове:* вкус, който напомня както по мирис, така и при консумация, на здрави, пресни маслини, набрани в оптималната фаза на зреене.

*Тревен:* характерен вкус на някои масла, който напомня на наскоро окосена трева.

*Мазно:* мирис на маслиново масло, добито в завод, където остатъчни количества петролни продукти, смазочни материали или минерални масла не са били напълно отстранени от машините

*Зелени листа (горчиво):* мирис на маслиново масло, получено от твърде зелени маслини или маслини, които са били смлени заедно с листата и клонките.

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

*Стипчиво:* характерно усещане при някои маслинови масла, които предизвикват в устата усещане за стягане.

*Сено*: характерен вкус на някои маслинови масла, които в по-голяма или по-малка степен напомнят за сушена трева.

*Заtoplено или прегорено*: характерен вкус на маслиново масло, предизвикан от прекалено и/или продължително загряване при обработката особено ако пастираното вещество се смесва температурно, ако това е извършено при неподходящи условия.

*Металически*: вкус, който напомня за метал. Характерен за маслинови масла, били в продължителен контакт, при неподходящи условия, с хранителни продукти или метални повърхности при нарязването, смесването, пресоването или съхранението.

*Кални отлагания*: характерен вкус на маслиново масло, събрано от претакането на отложено вещество от бъчвите и подземните цистерни.

*Плесен-влага*: характерен вкус на маслиново масло, получено от маслини, в които са се развили големи количества гъби и гъбена мая поради съхранението им на купчини при влажни условия в продължение на няколко дни.

*На застойло*: характерен вкус на маслиново масло, който е държан твърде дълго в контейнери за съхранение. Може да се прояви и при маслиново масло, опаковано за твърде продължително време.

*Остатък от пресовани маслини*: характерен вкус, който напомня за вкуса на остатъка от пресованите маслини.

*На подложка за пресоване*: характерен вкус на маслиновото масло, получено от маслини, пресовани върху мръсни подложки, в които има ферментирали остатъци.

*Граниво*: характерен вкус на всички масла и мазнини, които са преминали през процес на самоокисляване поради продължителен контакт с въздуха. Вкусът е неприятен и не може да се промени.

*На зрели маслини*: вкус на маслиновото масло, получено от зрели плодове, обикновено има блудкава миризма и е сладниково на вкус.

*Груб*: характерен за някои маслинови масла, които в устата създават усещане за плътност, кашкавост.

*Сапунлив*: вкус, който създава мирисното и вкусово усещане, напомнящо за зелен сапун.

*Сладък*: приятен вкус, не точно на захар, но се открива у маслинови масла, при които горчивите, стягащи и лютивни признаци не доминират.

*Зеленчукова вода*: характерен вкус, придобит от маслиновото масло в резултат на лошо претакане и продължителен контакт със зеленчуковата вода.

*Винено-оцетов*: характерен за някои маслинови масла вкус, който напомня за вино или оцет. Дължи се основно на образуването на ацетатна киселина, етил ацетат и етанол в количества, по-големи от обичайните за маслиновото масло.

## 5. ЧАШИ ЗА ДЕГУСТАЦИЯ НА МАСЛО

Виж главата, озаглавена „Чаши за дегустация на масло“.

## 6. ПОМЕЩЕНИЕ ЗА ТЕСТОВЕ

Виж главата, озаглавена „Ръководство за подредбата на помещението за тестове“.

## 7. АПАРАТУРА

Описаната по-долу апаратура е необходима за правилното изпълнение на поставените на дегустатора задачи и тя трябва да е на разположение във всяка от кабините и да е лесно достъпна:

- чаши (стандартни), съдържащи мострите, обозначени с легенда, която се състои от две случайно подбрани цифри или две цифри и букви. Обозначенията се правят с молив без мирис, който не може да се изтрива,
- часовникови стъкла с еднакви обозначения, които покриват чашите,
- лист за нанасяне на оценките (вж. Фиг. 2), съдържащ указания за използването му,
- химикалка или молив,
- малки таблички с нарязани ябълки,
- чаша вода при стайна температура.

## 8. МЕТОДОЛОГИЯ

Настоящият раздел предполага наличието на предварителни познания, необходими за извършването на сетивен анализ на студено пресовани маслинови масла и представлява опит за стандартизиране поведението и процедурите, спазвани от дегустаторите, включени в подобни тестове, които трябва да са запознати едновременно с общите и специфични изисквания за дегустация на маслиново масло.

### 8.1. Задължения на организатора на групата или наблюдателя (или на цялата група)

Организаторът на групата трябва да има съответното обучение и познания, за да бъде експерт по различните видове масла, на които ще попада по време на работата си. Той е ключова фигура в групата и отговаря за нейната организация и ръководство. Той свиква дегустаторите достатъчно рано и разяснява въпросите, които биха могли да имат във връзка с провеждането на тестовете, като се въздържа да изказва мнения за пробата.

Той отговаря за наличието на апаратурата и трябва да се погрижи за нейната чистота, за подготвянето и кодирането на мострите и представянето им на дегустаторите в съответствие с приложимия експериментален модел, както и за събирането и статистическата обработка на получените данни с оглед получаването на най-добри резултати при минимални усилия.

Работата на ръководителя на групата изисква наличието на сетивни умения, щателност при подготвянето на тестовете и тяхното стриктно уреждане, а също умение и търпение при планирането и провеждането им. Задължение на ръководителя на групата е да повдига духа на членовете на групата, като насърчава интерес, любознателност и дух на съзетателност у всеки от тях. Той трябва да вземе мерки мнението му да не става известно и да избегне вероятните лидери в групата да наложат своите критерии над останалите дегустатори. Той отговаря също и за обучението, подбора и наблюдението над дегустаторите, така че те да отговарят на изискванията за адекватно равнище на способности.

### 8.2. Тестови условия

#### 8.2.1. Количество проба

Всяка чаша съдържа 15 ml маслиново масло.

#### 8.2.2. Температура за провеждане на теста

Мострите маслиново масло, които подлежат на дегустация, се поддържат в чашите при температура от 28 °C,  $\pm$  2 градуса. Температурата е подбрана в тези граници, тъй като е най-подходяща за лесното констатиране на органолептични различия при нормална температура, когато маслиновите масла се използват като подправка. Друг фактор, който натежава в полза на тази стойност, е, че при по-високи или по-ниски температури или ароматичните компоненти са слабо летливи, или пък се получават летливи компоненти, характерни за загретите масла.

#### 8.2.3. Време за провеждане на тестовете

Сутринта е най-подходящото време за дегустация на маслиново масло. Доказано е, че през деня има периоди на оптимална сетивност, що се отнася до вкуса и обонянието.

Храненията се предшестват от период, в който вкусовата и обонятелна възприемчивост нараства, докато след тях чувствителността намалява.

Въпреки това този критерий не трябва да се довежда до крайност, тъй като гладът може да разсея дегустаторите, като снижи възможността им да правят разлика и, по-специално, критериите им за предпочитане и приемане.

## 9. ДЕГУСТАТОРИ

Хората, които работят като дегустатори при провеждането на органолептични тестове на трапезно маслиново масло, са обучени и подбрани в съответствие с уменията им да разграничават подобни мостри; трябва да се има предвид, че точността им се подобрява чрез обучение (виж съответния раздел).

За тестовете са необходими между 8 и 12 дегустатори, но е разумно да има няколко резерви, които да покрият възможните отсъстващи.

### 9.1. Общи препоръки за кандидатите и дегустаторите

Настоящите препоръки се прилагат за поведението на кандидатите и дегустаторите по време на работата им.

При свикване от страна на ръководителя на групата за участие в органолептичен тест, дегустаторът трябва да има възможността да се яви в уговореното време и да спазва следните изисквания:

- 9.1.1. Да не пуши поне 30 минути преди времето, уговорено за теста.
- 9.1.2. Да не използва парфюм, козметичен продукт или сапун, чиято миризма може да остане до провеждането на теста. Трябва да използва неароматизиран или слабо ароматизиран сапун за измиване на ръцете си, които изплаква и подсушава толкова често, колкото се налага за отстраняването на всякакви миризми.
- 9.1.3. Трябва да не е ял поне час преди провеждането на теста.
- 9.1.4. Ако физически се почувства неразположен и, по-специално, ако е засегнато усещането му за мирис или вкус или ако се намира под психологично въздействие, което му пречи да се концентрира върху работата си, дегустаторът информира ръководителя на групата, за да бъде отстранен от теста или да се вземат съответните решения, като се отчете възможността за отклонение от средната стойност на теста, проведен от групата.
- 9.1.5. Когато е спазил горните изисквания, дегустаторът заема мястото си в кабината, която му е предоставена, възможно най-организирано и тихо.
- 9.1.6. Когато е заел мястото си, проверява дали разполага с необходимата апаратура, подредена според изискванията, и проверява дали легендата върху чашата съвпада с легендата върху часовниковото стъкло.
- 9.1.7. Той прочита внимателно указанията, дадени върху листа за оценяване, и не започва разглеждането на пробата, докато не е абсолютно уверен относно задачата, която трябва да изпълни. При възникване на съмнения обсъжда своите затруднения насаме с ръководителя на групата.

- 9.1.8. Дегустаторът вдига чашата, като я държи покрита с часовниковото стъкло и я накланя леко; след това завърта чашата в това положение, за да намасли най-голяма част от вътрешността ѝ. След като завърши този етап, отстранява часовниковото стъкло и помирихва пробата, като вдъхва бавно и продължително, докато си състави критерий за анализираният маслиново масло. Помиришването не трябва да продължи повече от 30 секунди. Ако през това време не е оформено заключение, той прави кратка почивка, преди да продължи. След завършване на обонятелния тест дегустаторът преценява вкуса (цялостното обонятелно-вкусово-допирно усещане). За тази цел поема малка глътка от около 3 ml маслиново масло. От значение е да се разстеле маслото из цялата устна кухина, от предната част на устата и езика, по протежение на двете страни, до задната част и основата на небцето, тъй като е широко известно, че възприемането на четирите основни вкуса — сладко, солено, кисело и горчиво — променя интензивността си в зависимост от частта на езика и небцето.

Трябва да се подчертае, че от основно значение е достатъчно количество от маслиновото масло да се разпространи бавно върху задната част на езика към гърлото, докато дегустаторът се съсредоточава върху поредността, в която горчивите и пикантни дразнителни компоненти се проявяват; ако това не се направи, и двата дразнителя може да не се усетят при някои видове маслиново масло или пък горчивият дразнител може да бъде потиснат от пикантния.

Кратките последователни вдишвания през устата дават възможност на дегустатора не само да разстеле пробата, така че да покрие цялата уста, но също и да възприеме летливите ароматични компоненти в задната част на носа.

Допирното усещане също трябва да се вземе предвид. Следователно втечняемостта, вискозитетът и остротата или парливостта трябва да се отбележат, ако наличието им се открие и ако това се изисква от целите на теста, интензитетът им се измерва количествено.

- 9.1.9. Когато се прави органолептичен анализ на необработено маслиново масло virgin, в рамките на една сесия се анализира една проба, за да се избегне ефектът на контраст, който се получава при незабавното дегустиране на други мостри.

Тъй като последователното дегустиране създава умора или загуба на чувствителността, важно е да се използва продукт, който елиминира остатъчните количества маслиново масло в устата от предходните тестове.

Препоръчва се използването на резенче ябълка (около 15 g), което след съвкване може да се изхвърли в плювалник. След това устата се изплаква с малко вода при стайна температура. Поне 15 минути трябва да изминат след края на едната и началото на следващата дегустация.

## 9.2. Подбор на кандидатите

Този етап се осъществява от организатора на групата, който сам провежда събеседване с кандидатите, за да опознае личните им качества и останалите обстоятелства, свързани с тях. Физиологичните и психологически изисквания, които те трябва да удовлетворят, не са прекалено строги, тъй като на теория всеки нормален човек би трябвало да има възможност да участва. Фактори като пол, възраст, особени навици (пушене) и т.н. в днешно време са заменени с други, като например здравословно състояние, лична заинтересованост и време за работа.

По време на събеседването организаторът на групата обяснява на кандидата характерните особености на поставената му задача и горе-долу колко време ще му отнеме изпълнението ѝ. След това получава информация от кандидата, която да му даде възможност да прецени неговата заинтересованост и мотивация и с колко време разполага в действителност. Въпросникът по-долу може да послужи като отправна точка.

### ВЪПРОСНИК

Моля отговорете на следните въпроси:

- |  | Да                       | Не                       |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1. Желаете ли да се включите в работата по проблема?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Смятате ли, че работата може да допринесе за подобряване качеството на хранителните продукти на вътрешния и международния пазар?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Защо смятате така <sup>(1)</sup> ? .....  |                          |                          |
| .....  |                          |                          |
| .....  |                          |                          |
| 4. Трябва да имате предвид, че ще Ви се наложи да дегустирате масла, когато Ви повикат за целта. Готови ли сте да направите това?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Бихте ли желали да сравните обонятелните и вкусовите си умения с такива на ваши колеги?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Разполагате ли със свободно време? Достатъчно ли сте независим да организирате ежедневната си работа, както желаете?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7. Ако имате йерархична зависимост, смятате ли, че ако Ви се наложи да отсъствате от обичайната си работа за изпълнение на задача до половин час в няколко случая в рамките на определен брой последователни дни, биха Ви позволи да го сторите? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8. Бихте ли имали възможност да наваксате пропуснатото време на работното си място поради участието си в сетивните анализи?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9. Смятате ли, че трябва да Ви се заплати за извършената работа?   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10. По какъв начин?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Организаторът използва тази информация, за да извърши подбор на кандидатите и отхвърля онези, които показват слаб интерес към подобен тип работа, не са на разположение или не могат ясно да се изразяват.

#### 9.3. Определяне на „средния праг“ на групата за „характерни признаци“

Внимателно подберете четири вида маслиново масло, всяко от които се счита за представително, с оглед един от следните признаци: мухлясало, винено, граниво или горчиво, и има възможно най-ясен и силен интензитет.

Вземете равни части от всяко маслиново масло и подгответе мостри, чиито концентрации се различават в съотношение към две, включително чрез последователни разреждания със съответния помощен материал, докато разликата между чашата, съдържаща помощния материал, и последните две или три разреждания, престане да се усеща. Последната двойка трябва да е от чаши, които съдържат само помощния материал.

Допълнете поредицата с чаши, съдържащи по-високи концентрации, до общия брой от осем.

Подгответе достатъчни количества мостри в различни концентрации, така че пълната поредица за всеки признак да бъде предоставена на всеки кандидат.

За определяне на „средния праг“ на кандидатите за всеки от признаците, разпайте на всеки от тях чаша, съдържаща 15 ml от всяка от подготвените концентрации и друга, съдържаща 15 ml само от помощния материал. След завършване на теста, кандидатът посочва дали са едни и същи, или различни.

Повторете същия тест за останалите концентрации от разглеждания признак.

Отбележете броя получени правилни отговори за всяка концентрация, дадени от всички дегустатори и изразете цифрата като процентно съотношение от проведените тестове.

<sup>(1)</sup> Опишете каква е ползата от органолептичния анализ на някакъв хранителен продукт или, ако желаете, на маслиновото масло.

След това съставете графика, като върху абсцисата нанесете във възходящ ред тестваните концентрации, а върху ордината — процентът правилни разпознавания за всяка от тях.

Фигура 1 представлява практически пример на горните указания. Прагът на разпознаване се определя чрез екстраполиране на ординатната точка от кривата, представляваща 75 % верни преценки, върху абсцисата.

„Праговата“ концентрация, която може да е различна за всеки първоначален вид маслиново масло, тъй като зависи от интензитета на съответния признак, трябва да е подобна у различните групи кандидати за различните групи концентрации; тя не е свързана с навици или тенденциозни предпочитания. Поради това е отправна точка, обща за коя да е група хора, и може да се използва за уеднаквяване на различните групи от гледна точка единствено на обонятелната и вкусовата им чувствителност.

Въз основа на получената за групата прагова концентрация, извършете следните действия:

Подгответе поредица увеличаващи се и намаляващи концентрации, така че „праговата концентрация“ да е на десето място в скалата. Естествено 11-та и 12-та концентрация ще бъдат по-разредени, поради което ще бъде по-трудно да се разпознае наличието на маслиново масло, притежаващо подбрения признак.

Като за основа се вземе концентрацията  $C_{10}$ , останалите мостри могат да се подготвят в съответствие със следната формула:

$C_{10} \times a^n$ , където „а“ е константа, индекс на разреждане, който се равнява на 1,5, а „n“ е степенният показател, който получава стойности между 9 и -2.

Пример: дадено е, че полученият праг за граниво маслиново масло е 0,32;  $C_{10} = 0,32$ , поради което, тъй като „а“ = 1,5, поредицата мостри ще имат следните концентрации:

Пример	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Концентрация	12,30	8,20	5,47	3,65	2,43	1,62	1,08	0,72	0,48	0,32	0,21	0,14

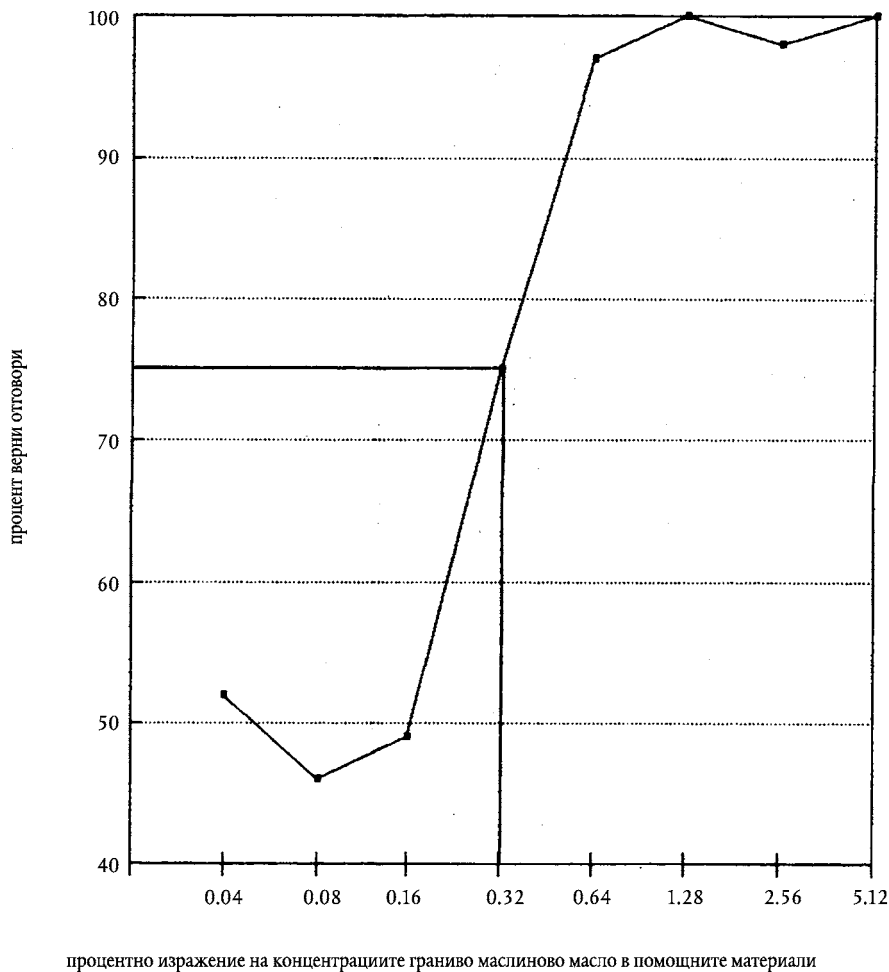
Ако горната процедура се повтори за останалите три признака въз основа на съответните им прагове, които се изчисляват, както е посочено по-горе, ще се получат скали с подобни ароматични интензитети за всеки от дразнителите за всички лаборатории, въпреки че дефектите на първоначалните маслинови масла могат да бъдат усещани с различна интензивност.

#### 9.4. Подбор на дегустатори по метода за класиране на интензитета

В рамките на процедурата за подбор трябва да има два или три пъти повече кандидати, отколкото са необходими за групата, така че да бъдат подбрани хората с най-добра чувствителност или способности да правят разграничение. Винаги е полезно да се използва същият продукт, който впоследствие ще бъде анализиран (поради което винаги се използва маслиново масло).



Фигура 1



При подбор на метода не трябва да се забравя, че освен ефективна, приетата процедура трябва да е и възможно най-пестелива, що се отнася до количеството маслиново масло, броя мостри, които да се изпратят, и времето, използвано за осъществяването на подбора. Ефективността на процедурата за подбор се основава на избора на оптималните равнища за следните три зависими променливи: а) „цена“, определена от броя на тестовете; б) „съотношението“ на потенциално подходящи кандидати, които по случайност за съжаление за били отстранени по време на процедурата за предварителен подбор и в) „съотношението“ на кандидатите, които по случайност са преминали през процедурата за подбор, въпреки че са неподходящи.

Изменят се четири пункта от избраната процедура за подбор, а именно тестът за класиране на интензитета, описан в Специалното техническо издание, бр. 440, стр. 53 на Американското дружество за провеждане на тестове и материалознание, по следния начин:

1. Намаляване броя мостри в поредицата.
2. Разширяване обхвата дразнители с оглед увеличаване броя на обонятелно-вкусовите критерии, въз основа на които се провежда подборът, за да бъдат адаптирани към най-честите дефекти, които се забелязват в маслиновото масло.
3. Промяване на концентрационните съотношения в поредицата.
4. Статистическа обработка на резултатите.

*Необходимо оборудване*

- бутилки или стъклени колби от 1500 ml
- чаши за дегустация с тъмен цвят
- градуирани епруветки от 10, 15, 1000 и 1500 ml.

*Необходими продукти*

- парафин по Мерк (Референт 7160, DAB 8, USP XX) или маслен помощен материал без вкус или мирис
- маслиново масло: мухлясало, винено, граниво и горчиво.

## 9.4.1. Процедура

След подготовяне на разтворите преминайте към етапа на подбора, като започнете с 25 кандидати при спазване на описаната по-долу методология за всеки от дразнителите:

1. Подготвят се поредица от 12 чаши за дегустация, отбелязани с код (по една поредица за всеки кандидат). Наливат се по 15 ml от всяка от различните концентрации, подготвени в съответствие с формулата  $C_{10} \times a^n$ , във всяка отделна чаша за дегустация.
2. След напълване на чашите за дегустация, същите трябва да останат покрити с часовниково стъкло в помещението за дегустация при температура между 20 и 22 °C поне за час с цел изравняване на температурата им с тази в помещението.
3. След това организаторът подрежда 12 чаши за дегустация от всяка поредица в редица, по низходящ ред на концентрация.

Следващата стъпка е кандидатите да проведат теста самостоятелно в съответствие със следните указания:

## 9.4.2. Указания за кандидатите

Дванадесетте чаши за дегустация, подредени пред кандидатите, съдържат разтвори за дразнителите мухлясал, винен, гравив или горчив. Разграничителният фактор между съдържанието на чашите за дегустация е интензитетът на миризмата. Чашата с най-силна миризма е разположена в най-далечната лява част, а останалите чаши са подредени в низходящ ред на интензитета, влясно от нея. Най-дясната чаша може да излъчва толкова слаба миризма, че да е невъзможно да бъде усетена.

Направете следното: запознайте се с миризмата на всяка от чашите за дегустация в поредицата. Започнете отлясно (с № 12) и се опитайте да запомните интензитета на всички миризми, без да се преуморявате.

Когато смятате, че сте свикнали със скалата за концентрация на миризмите, напуснете помещението.

Междувременно организаторът отстранява една от чашите за дегустация от поредицата и я поставя до последната влясно, като премества всички останали, за да запълни оставеното място. След това се върнете в помещението и продължете теста.

Тестът включва следното:

Отстранената от поредицата чаша за дегустация трябва да бъде върната на точното си място. За целта я помиришете и сравнявайте с останалите, колкото често желаете, като имате предвид, че за да бъде върната правилно, трябва да мирише по-силно от пробата, намираща се непосредствено влясно, и по-слабо от тази вляво. Тестът се повтаря с още три чаши.

На всеки кандидат се издава формуляр в допълнение на току-що описаните указания за улесняване провеждането на теста и събирането на отговорите.

## ПОДБОР НА КАНДИДАТИТЕ

Тест № ..... Признак .....

Извадената чаша е от позиция № .....

Дата ..... Име .....

## 9.4.3. Получаване на резултатите

Организаторът на групата отразява данните за всеки от кандидатите по следния начин за улесняване на провеждането им:

Име на кандидата	Изучаван признак	Съобщен пореден брой (K')	Действителен пореден брой (K)	Оценка (K' - K)²
.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....

## 9.4.4. Процедура за статистическо класиране

В настоящия случай на подбор чашите за дегустация, които трябва да бъдат поставени на точното си място, са едни и същи за всички кандидати. Според статистически изчисления, проведени за целта, те съответстват на следните позиции в поредиците за всеки от признаците:

Мухлясал (М)	Винен (В)	Гранив (Г)	Горчив (Гч)
Чаша № (10, 5, 7, 2)	Чаша № (11, 3, 8, 6)	Чаша № (7, 4, 10, 2)	Чаша № (6, 3, 11, 9)

Числото, съответстващо на позицията на чашите в поредицата, не може да се променя, тъй като статистическите изчисления за теста са направени с оглед вероятността чашите да бъдат случайно върнати на точното си място.

За да бъде крайно затруднително предаването на информация между кандидатите, организаторът на групата взема мерки:

1. да няма възможност за контакт между кандидатите. За всеки кандидат се използват различни легенди;
2. да няма начин, по който кандидатите да установят позицията на чашите, които са били извадени;
3. въпреки че на кандидатите се дават същите, обозначени по-рано чаши, редът, по който се подават на всеки кандидат, трябва да се променя.

След това всеки от кандидатите се класира в зависимост от показаните от него резултати, по следния начин:

Нека  $e_1^i, e_2^i, \dots, e_{12}^i$  да бъдат 12-те чаши с 12-те съответни концентрации на признака „i“ (i може да бъде един от четирите признака: мухлясал, винен, гранив и горчив), подредени по низходящ ред на интензивност.

Нека  $e_k^i$  да бъде една от извадените чаши, а  $K'$  позицията, която ѝ е дал кандидатът, когато я е поставил обратно в поредицата. Стойностите на  $K$  и  $K'$  са цели числа между 1 и 12 включително, които съответстват на реалния номер на мястото на избраната чаша и съответно на номера на мястото, даден ѝ от кандидата.

Нека  $T$  (максимално допустимо отклонение) да бъде предварително определена величина, която в нашия случай е равна на 3, така че ако  $K' - K > T$  кандидатът автоматично се отхвърля <sup>(1)</sup>.

Ако, обратно,  $K' - K \leq T$ , на теория кандидатът е приет и може да продължи теста, тъй като може да върне дразнителя на точно същата позиция или поне съвсем близо до нея.

В този случай класирането, дадено на кандидат, който е пресенил определен дразнител (а именно концентрацията), например в поредицата мухлясал (М), ще бъде равно на квадрата от разликата между точния номер на чашата в поредицата и позицията, на която кандидатът я е върнал. Т.е.

$$P_h^{(M)} = (K' - K)^2.$$

Тъй като тези действия ще бъдат извършени от всеки кандидат за четирите дразнителя (концентрации) за всеки от признаците, частичното класиране за признака (например М) ще бъде:

$$Z^M = P_h^{(M)} + P_j^{(M)} + P_l^{(M)} + P_m^{(M)}$$

По-долу са дадени някои примери, за да се улесни разбирането на операцията.

Пример 1:

Нека приемем, че отговорите, дадени от кандидат А за четирите признака, изведени от поредицата за признак (i), са, както следва:

Точна позиция на чашата в поредицата (K)	Позицията, на която е била върната от кандидата (K')	Отклонение от точната позиция (K' - K)
7	7	7 - 7 = 0
4	5	4 - 5 = -1
10	6	10 - 6 = 4 <sup>(1)</sup>
2	4	2 - 4 = -2

<sup>(1)</sup> Този кандидат е бил отхвърлен, тъй като е получил  $T > 3$  на теста.

<sup>(1)</sup> Организаторът на групата оказва натиск кандидатите да действат разумно, т.е. без да губят чувствителност поради умора на обонянието.

Пример 2:

Нека приемем, че даден кандидат преподреди чашите за даден признак по следния начин:

Точна позиция на чашата в поредицата (К)	Позицията, на която е била върната от кандидата (К')	Отклонение от точната позиция (К' - К)
7	7	7 - 7 = 0
4	4	4 - 4 = 0
10	7	10 - 7 = 3
2	3	2 - 3 = -1

Този кандидат не е отхвърлен. Получил е класиране както следва:

$$Z^i = 0^2 + 0^2 + 3^2 + (-1)^2 = 10$$

Окончателното класиране на кандидата, което определя неговото приемане или отхвърлянето му като дегустатор, в зависимост от дадените отговори относно четирите признака, които се разглеждат, се извършва по следния начин:

$$P_h^M + P_j^M + P_l^M + P_m^M = Z^M$$

$$P_h^B + P_j^B + P_l^B + P_m^B = Z^B$$

$$P_h^G + P_j^G + P_l^G + P_m^G = Z^G$$

$$P_h^{Gч} + P_j^{Gч} + P_l^{Gч} + P_m^{BтГч} = Z^{Gч}$$

$$Z \text{ окончателно} = Z^M \dots Z^{Gч}$$

Където: М = Мухлясал

В = Винен

Г = Гранясал

Гч = Горчив

Остава да се определи до каква максимална стойност на Z може да се счита, че кандидатът има добро равнище на възприятие, обонятелна памет и интелектуална организираност, за да може да предоставя правилни отговори при разглеждането на четирите дразнителни. Очевидно Z не получава отрицателни стойности, а  $Z = 0$  означава, че кандидатът е разпознал и правилно е определил количествените характеристики на 16 интензитета, които са му представени (по четири за всеки от признаците). Стойности на Z, различни от нула, показват, че кандидатът е разпознал областите от скалата, от които подобрите интензитети са били извадени, но в рамките на тези области не е успял да открие точната позиция, тъй като способността му да разграничи скалата на интензивност, която му е представена с оглед на един или повече дразнителни, не е задоволителна.

По тези причини трябва да се определи критична стойност ( $Z_c$ ), така че ако кандидатът случайно върне чашите в рамките на областите, които е разпознал по-рано, вероятността за крайно класиране Z със стойност по-малка от  $Z_c$  е достатъчно малка величина ( $\alpha$ ), която може да бъде предварително определена. С други думи трябва да се създадат гаранции, че вероятността, при използване на описаната процедура, за подбор на дегустатор в групата, който не притежава достатъчно способности за разграничение относно интензитетите на дразнителите, използвани в процеса на подбор, е по-малка от  $\alpha$ .

Когато се определи стойността за  $\alpha$  (в нашия случай по-малко от 0,05),  $Z_c$  се получава от вероятностното разпределение на променливата Z, което от своя страна зависи от вероятностните разпределения на променливите P (K').

След съответни статистически изчисления стойността  $Z_c$  възлиза на 34.

Когато Z класирането на всички кандидати завърши, кандидатите, чието класиране надвишава 34, се елиминират.

Вж. класирането на кандидати А и Б, например:

Признак	Кандидат А	Кандидат Б
Мухлясал (М)	$Z^M = 10$	$Z^M = 12$
Винен (В)	$Z^B = 10$	$Z^B = 11$
Гранив (Г)	$Z^G = 10$	$Z^G = 15$
Горчив (Гч)	$Z^{Gч} = 4$	$Z^{Gч} = 0$
	34	38

Като се има предвид, че двамата кандидати имат съответни Z стойности от 34 и 38, кандидат А ще бъде избран, докато кандидат Б — отхвърлен. Когато всички кандидати, класирани над 34, са елиминирани, останалите се класират в съответствие със Z стойностите си до избирането на 12-те най-добри кандидати.

#### 9.5. Обучение

Основните цели на етапа на обучението са:

- a) да се запознаят дегустаторите с многобройните обонятелни, вкусови и сетивни вариации, които се откриват в студено пресованите маслинови масла;
- b) да се запознаят дегустаторите със специфичната сетивна методология;
- v) да се повишат индивидуалните умения за разпознаване, посочване и количествено определяне на сетивните признаци;
- г) да се подобри чувствителността и паметта относно различните разглеждани признаци, така че крайният резултат да представлява точен и последователен анализ.

Етапът на обучението обикновено е свързан с определен брой занятия, в зависимост от възможностите на групата да се учи, по време на които, след като анализират маслиновото масло самостоятелно, дегустаторите обсъждат с организатора на групата трудностите, които са срещнали, и коментират дадените оценки с цел уеднаквяване на критериите и вижданията си.

Достигнатият след определен брой занятия стандарт се определя като процентно увеличение на правилните отговори — ако се използват опитни постановки за определяне способността за разграничение — или като се анализира динамиката на средните индивидуални оценки на групата, когато се провеждат тестове със скали.

Практическата полза от периода на обучение е обсъждана подробно, но понастоящем то се счита за ефективно и дори от основополагащо значение, ако трябва да се получат точни, прецизни сетивни данни.

#### 9.6. Проверка на работата

Групи опитни дегустатори обикновено редовно и постоянно провеждат дегустации, включително сетивни тестове, които изискват много усилия от тяхна страна. Решения от голямо технологично и търговско значение зависят в огромно мнозинство от случаите от тяхната преценка. По тези причини след подбора и обучението им работата на дегустаторите трябва да се проверява, за да се подсигури правилността на представяните от тях резултати.

След сформирането на групите и преминаването през рутинни опитни постановки очевидно би било необходимо редовно да се проверява тяхната работа през подходящи интервали от време.

### 10. ПРОЦЕДУРА ЗА ОРГАНОЛЕПТИЧНИЯ АНАЛИЗ НА НЕОБРАБОТЕН МАСЛИНОВО МАСЛО VIRGIN

При удовлетворяване на посочените в горните стандарти условия, наличието на необходимите съоръжения и материална база и успешния подбор на групата всеки дегустатор помирихва и вкухва<sup>(1)</sup> пробата маслиново масло, поставена за анализ в чашата за дегустация. Той анализира обонятелните, вкусови, допирни и кинетични възприятия с помощта на листа, показан на фигура 2, върху който отразява съответните „нотки“ и степента им на интензивност. Следващата стъпка представлява оценка качеството на маслиновото масло.

#### 10.1. Използване на листа на фигура 2 (описание на аромата и оценка на качеството).

Някои от най-характерните сетивни възприятия, откривани по-често у маслиновото масло, които описват аромата му, са отразени в лявата страна на страницата. Ако дегустаторът открие други дразнителни, които не съответстват на включените в списъка описания, той ги отбелязва в графа „други“, като използва описанието/ята, които ги определят възможно най-точно.

Подлежащите на възприятие дразнителни се преценяват в зависимост от техния интензитет, който се посочва с кръстче (+) в съответното каре, като се съблюдават следните критерии:

- 1: на границата на възприемане,
- 2: възприятието е слабо,
- 3: възприятието е средно,
- 4: възприятието е силно,
- 5: възприятието е крайно.

В дясната страна на страницата има скала от 1 до 9 (9 за изключително качество, 1 за най-лошото), която дегустаторите използват, за да дадат единна цялостна оценка на характерните особености на разглежданото маслиново масло. Тази оценка съответства на силните страни и дефектите на маслиновото масло, които вече са били отбелязани от лявата страна на листа.

<sup>(1)</sup> Може да се въздържа, ако установи крайно или силно неприятен признак в миризмата, като отрази този факт в листа за оценяване като изключителен случай.

Първата колона (дефекти) от таблицата за оценка е разделена на пет части. Затова и класификацията на маслиновите масла се основава най-вече на пълното присъствие или отсъствие на свидетелстващи за дефекти аромати, както и доколко значителни или интензивни са същите. Въпреки това, тъй като скалата за оценка предоставя максимално 9 точки, определени нюанси или аспекти трябва да се вземат предвид с оглед подпомагане процеса на окончателно решение относно цялостната оценка на качеството, а тези нюанси или аспекти са описани във втората колона, озаглавена „характерни особености“.

#### 10.2. Окончателна оценка

Ръководителят на групата събира попълнените от всеки от дегустаторите формуляри и проверява дали сетивните признаци, интензитетът на възприятието и отразяването им върху профилиращия лист съответстват с оценката на маслиновото масло, предоставена на листа за оценяване. Ако налице е значителна разлика, ръководителят кара дегустатора да провери листа за оценяване.

Ако е необходимо дегустаторът повтаря теста.

Накрая ръководителят на групата съставя таблица с оценките на цялата група и изчислява аритметичната средна стойност и равнището на грешка (от средната стойност).

Единствено в случаи на анализи за преразглеждане на решението групата повтаря тестовете с оглед получаването на тройна оценка на пробата; окончателната оценка, в десетично число, представлява средната стойност от наличните три оценки.

Ако средната оценка на интензитета на горчивина и/или острота надвишава 2,5, маслиновото масло се отбелязва по съответен начин, като се отразява изрично, че същият е горчив и/или остър.

*Изразяване на резултатите:* въз основа на средната оценка ръководителят на групата определя категорията, в която попада пробата, като се съблюдават границите, залегнали в приложение I. Отчетът от анализа отразява единствено тази категория.

*Бележка:* Мострите се пазят запечатани в хладилник до анализирането им и трябва да бъдат връщани в него след всеки отделен анализ до трикратното провеждане на теста.

## Фигура 2

## Необработено маслиново масло virgin

## Формуляр за профил на продукта

Бележки за обонятелните, вкусови и допирни характеристики (2)

	0	1	2	3	4	5
С вкус на маслина (зряла и зелена) (1)						
Ябълка .....						
Друг зрял плод .....						
Зеленина (листа, трева) .....						
Горчиво .....						
Остро .....						
Сладко .....						
Друг/и позволени признаци .....						
(Уточнете .....						
.....)						
Кисел/винен/оцетов/киселинен (1) .....						
Груб .....						
Металически .....						
Плесен/влага (1) .....						
Кално отлагане .....						
Гнило .....						
Гранив .....						
Друг/и непозволени признаци .....						
(Уточнете .....						
.....)						

(1) Да се запраска, ако е неприложимо.

(2) Възприятие:

0: (3)

1: на границата на възприемане,

2: възприятието е слабо,

3: възприятието е средно,

4: възприятието е силно,

5: възприятието е крайно

## Таблица за оценка

Дефекти	Характерни особености	Цялостна оценка в точки:
Никакви	С вкус на маслини	9
	С вкус на маслини и на други свежи плодове	8
		7
На границата или слабо възприемаем	Слаб вкус на плодове от всякакъв тип	6
Възприемаем	Доста несъвършен вкус на плодове, аномални миризми и вкусови усещания	5
Значителен, на границата на приемливото	Явно несъвършен, неприятни миризми и вкус	4
Силен и/или значителен, явно доловим		3
		2
		1

Забележки: .....

Име на дегустатора: .....

Легенда на пробата: .....

Дата: .....

**СЕТИВЕН АНАЛИЗ: ОБЩ ОСНОВЕН РЕЧНИК**

## 1. ОБХВАТ

Целта на настоящия стандарт е да представи заедно общите термини, използвани в сетивния анализ, като даде съответни определения.

## 2. РЕЧНИК

2.1. **Обща терминология**

*Сетивен анализ* (съществително):

преглед на органолептичните признаци на даден продукт, извършен чрез сетивните органи.

*Възприятие* (съществително):

сетивно познание за външни предмети и събития.

*Органолептичен* (прилагателно) (признак):

описва признак на даден продукт, който може да се възприеме от сетивните органи.

*Експерт* (съществително):

(относно прегледа на органолептичните признаци)

дегустатор, който е специализиран в сетивния анализ на определен продукт и има основни познания за процеса на подготовката му и пазарните предпочитания.

*Дегустатор* (съществително):

проницателно, чувствително, обучено лице, подбрано да оценява органолептичните признаци на даден хранителен продукт със сетивните си органи.

*Група:*

няколко оценители, които са специално подбрани и обучени, събрани за осъществяването на сетивен анализ на даден продукт при контролирани условия.

*Усещане* (съществително):

субективно явление, което е резултат от дразненето на сетивната система. Това явление може да бъде субективно разграничено или обективно определено от съответния сетивен орган в зависимост от естеството или вида на дразнителя и неговия интензитет.

*Чувствителност* (съществително):

способността за количествено и качествено възприемане на дразнител с нисък интензитет или на несъществени различия между дразнителите с помощта на сетивните органи.

*Дегустация* (съществително):

действие, което включва възприемането, анализа и преценката на органолептичните признаци на даден продукт, по-специално обонятелните, вкусовите, допирните и кинестетичните признаци на даден хранителен продукт.

*Приемане* (съществително):

акт на лице или група хора на благоприятно приемане на даден продукт.

*Хармония* (съществително):

признак на даден продукт, който поражда цялостно приятно усещане. Това усещане се дължи на възприемането на компонентите на продукта като обонятелни, вкусови, допирни и кинестетични дразнителни, тъй като същите присъстват в подходящи съотношения на концентрация.

*Приемливост* (съществително):

състояние на даден продукт, който се приема благоприятно от лице или група хора, що се отнася до органолептичните му признаци.

*Разграничаване* (съществително):

акт на качествено и/или количествено оразличаване между два или повече дразнителни.

*Компенсация* (съществително):

резултат от взаимодействието на съчетание от дразнителни по начин, че всеки се възприема с по-малък интензитет отколкото при самостоятелното му въздействие.



*Аспект* (съществително):

съчетание от органолептични признаци, възприемани зрително: размер, форма, цвят, строеж, мътност, чистота, втечняемост, пяна и ефервесцентност. Този термин се предпочита пред термина външен вид.

*Признак* (съществително):

характерна особеност, която е възможно да се възприеме.

## 2.2. **Физиологични термини**

*Дразнител* (съществително):

физически или химически агент, който предизвиква конкретна реакция на външните или вътрешни сетивни рецептори.

*Вкус* (съществително):

(чувство за вкус)

сетиво, чиито рецептори са разположени в устата, най-вече върху езика и се активират от различнисложни химически вещества в разтвор.

*Вкусов* (прилагателно):

описва признак на даден продукт, който може да дразни вкусовия апарат, като възбужда усещания, отнасящи се до един или повече от четирите основни вкуса: сладко, солено, кисело и горчиво.

*Рецептор* (съществително):

особено образувание на сетивния орган, което може да се възбуди и е способно да възприеме даден дразнител и да го превърне в нервен импулс.

*Бележка:* Рецепторите се класифицират в зависимост от типа енергия, свързана с дразнителя (светлина, топлина, звук и т.н.).

*Обоняние* (съществително):

функция на обонятелния апарат, свързана с възприемането и разграничаването на молекули от външната среда, които достигат до него пряко или непряко през носа и са в газообразно състояние.

*Интензитет* (съществително):

величина на енергията на даден признак, която може да се измери по количествена скала от стойности, надвишаващи определен праг.

*Приспособяване* (съществително):

временна промяна на чувствителността при възприемане на сетивни дразнители поради продължителното и многократно излагане на определен или подобен на него дразнител.

*Потискане* (съществително):

липса на реакция у сетивния орган или част от него въпреки въздействието на подходящ дразнител, чийто интензитет е над определен праг.

*Реакция* (съществително):

действие, състоящо се в реакцията на сетивните клетки на въздействието на един или повече дразнители, свързани с определен сетивен орган.

*Плънота* (съществително):

допирно усещане, възприемано в устата, което придава определена степен на плътност, вискозитет, консистентност или компактност на даден продукт.

*Мирис* (съществително):

свежа, приятна, дъхава миризма.

*Мириша* (глагол):

(деятелен залог, използва се в „да помириша“)

описва действието на възприемане на миризмата.

*Обективен* (прилагателно):

- а) описва онова, което създава вярна, проверима представа за обекта, като се абстрахира от човешките фактори (например предпочитания, навици, склонности);
- б) описва способа, който с помощта на сетивни или инструментални методи намалява самозараждащите се грешки.

*Бележка:* Използването на термина „инструментален“ като синоним не се препоръчва.

*Субективен* (прилагателно):

описва онова, което предизвиква възприятие, повлияно не единствено от дразнителя, но и от начина, по който мислим и чувстваме.

**Кинестезия:**

усещания, проявяващи се в резултат на натиск върху пробата, предизвикан от движението в устната кухина или с пръсти (например: притискане на сирене между пръстите)

**Праг (съществително)****Абсолютен праг:**

минималната стойност на сетивен дразнител, която предизвиква:

- появата на усещане (праг на дразнителя или праг на разпознаване) или
- разпознаване на усещането (праг на разпознаване).

**Праг на различието:**

минималната стойност на сетивен дразнител, която предизвиква възприемаема разлика в интензитета на усещането.

**Краен праг:**

максимална стойност на дразнителя, над която увеличаването на интензитета вече не се възприема.

**Праг на предпочитание:**

минималната количествена стойност на дразнителя или критичната надпрагова стойност на същия дразнител, при която се проявява реакция на привличане или отхвърляне по отношение на неутрален дразнител, например при избора между подсладен разтвор и вода.

**Бележка:** Трябва да се направи разграничение между прага на абсолютното предпочитание и прага на разграничителното предпочитание.

**Подпрагов (прилагателно):**

под абсолютния праг.

**Надпрагов (съществително):**

над абсолютния праг.

**Сетивна утора:**

особена форма на сетивно приспособяване, при която се проявява намаляване на чувствителността.

**Колпенсация (съществително):**

резултат от взаимодействието на съчетание от дразнители по начин, че всеки се възприема с по-малък интензитет, отколкото при самостоятелното му въздействие.

**Синергичен (прилагателно):**

съвместно въздействие или ефект на определени вещества, при които интензитетът на органолептичните признаци в резултат от съчетанието надвишава сумата на интензитетите на всеки признак, взет поотделно.

**Контрастен ефект:**

увеличаване в резултат на разликите между два едновременни или последователни дразнители.

Обратен на конвергиращия ефект.

**Конвергиращ ефект:**

намаляване в резултат на разликите между два едновременни или последователни дразнителя; обратното на контрастния ефект.

**2.3. Терминология, свързана с органолептичните признаци****Киселинен (прилагателно):**

- а) описва основния вкус, предизвикан от разредени водни разтвори на повечето киселинни вещества (например лимонена киселина, млечна киселина, винена киселина);
- б) описва признака на чисти вещества или смеси, които предизвикват този вкус.

Съответното съществително е киселинност.

**Кисел (прилагателно):**

описва обонятелно-вкусовото усещане, при което обикновено доминират киселините, получени в резултат на ферментация, както и на хранителните продукти, които предизвикват това усещане.

Някои фактори, които допринасят за това усещане, са свързани с ферментацията, например млечната или оцетова ферментация на даден хранителен продукт.

*Горчив* (прилагателно):

- a) описва основния вкус, предизвикан от разредените водни разтвори на различни вещества, като например хинин, кофеин и определени алкалоиди;
- b) описва признак на чистите вещества или смеси, който предизвиква този вкус.

Съответното съществително е горчивина.

*Солен* (прилагателно):

- a) характерно усещане, възприемано чрез сетивата за вкус, най-типичният пример за което се предизвиква от разтвора на натриевия хлорид;
- b) описва признака на чистите вещества или смеси, който предизвиква този вкус.

Съответното съществително е соленост.

*Сладък* (прилагателно):

- a) описва основния вкус, предизвикан от водни разтвори на различни вещества като захарозата;
- b) описва признака на чистите вещества или смеси, който предизвиква този вкус.

Съответното съществително е сладост.

*Стипчив* (прилагателно):

- a) описва сложното усещане, предизвикано в устата от ненаситени водни разтвори на продукти като някои от танините (например танин от каки или трънкосливка);
- b) описва признака на чистите вещества или смеси, който предизвиква този вкус.

(Съответното съществително е стипчивост).

*Прикус* (съществително):

прикусът означава съчетание от обонятелни, вкусови, допирни и кинестетични усещания, които дават възможност на оценителя да разпознае и установи наличието на многостепенен благоприятен или неблагоприятен критерий.

*Вкус* (съществително):

- a) усещания, породени от дразненето на вкусовите папили от някои разтворими вещества;
- b) признак на конкретното усещане, предизвикано от такива вещества.

*Основен вкус* (съществително):

кой да е от характерните вкусове, за които се твърди, че са четири: сладко, солено, кисело, горчиво.

*Мирис* (съществително):

- a) съчетание от усещания, възприемани от органа за обоняние при подушване на определени летливи вещества;
- b) свойство на специфичното усещане, предизвикано от някое от горепосочените вещества.

*Аромат* (съществително):

- a) приятни усещания, възприемани непряко от органа за обоняние при вкусването на храна;
- b) в парфюмерията и неспециализираната реч терминът се използва за същите усещания, възприемани направо през носа.

*Следвкус, остатъчен вкус* (съществително):

съчетание от усещания, възприемани след отстраняване на дразнителя от устата, което се отличава от усещанията, възприемани преди това.

*Ароматен* (прилагателно):

- a) описва признака на чистите вещества или смеси, които, ако бъдат вкусени, създават усещания, известни като аромат;
- b) описва продуктите, които при пряко разглеждане с нос създават усещания за мирис и свежест.

**Строеж** (съществително):

характерните особености на твърдото или реологично състояние на даден продукт, чието съчетание дразни механичните рецептори по време на вкусване, по-специално тези, разположени в устата.

**Бележка:** Терминът се отнася единствено до обективните признаци, не и до преизвиканите усещания, които се обозначават с общи понятия, като консистенция, фиброзитет, мазнота и т.н.

**Покриване на устата:**

действие, състоящо се в допира на храна, намираща се в устата, до всички чувствителни области в нея, така че устните усещания, които тя преизвиква, могат да се възприемат.

**Бележка:** Този речник може да се разшири, като се разгледа стандарти ISO 5492, Части от I до V, както и други издания, като например на J. L. Magnen, озаглавено *Les Cahiers Techniques du Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation* и др.

## ЧАША ЗА ДЕГУСТАЦИЯ НА МАСЛИНОВО МАСЛО

### 1. ОБХВАТ

Целта на този стандарт е да направи описание на характеристиките на чашата, предназначена за употреба при органолептичния анализ на трапезни масла (мирис, вкус, привкус).

Освен това той описва адаптирания нагревателен уред, необходим за достигане и поддържане на подходящата за този анализ температура.

### 2. ОПИСАНИЕ НА ЧАШАТА

Рисунката на фигура 1 представлява опит за установяване на оптималните характеристики, които приспособление от този вид е желателно да притежава, уточнени по следния начин:

- a) максимална устойчивост за предотвратяване накланянето на чашата и разливането на маслиното масло;
- b) основа, която плътно пасва на вдлъбнатините на нагревателния уред, така че дъното на чашата се загрева равномерно;
- v) форма, която е най-широка при основата, така че летливите компоненти на маслиното масло да бъдат лесно освобождавани, но стеснена в горната част, така че същите компоненти да се концентрират с оглед по-доброто им възприемане и разпознаване чрез обонянието;
- г) да е направена от оцветено в тъмно стъкло, за да не може дегустаторът да възприема цвета на маслиното масло и по този начин да се елиминират възможните предразсъдъци или да се предотврати формирането на предварително мнение или склонност.

#### 2.1. Размери

Чашата е скицирана на фигура 1 и е със следните размери:

— Общ капацитет .....	130 ml ± 10 ml,
— Височина .....	60 mm ± 1 mm,
— Диаметър на отвора .....	50 mm ± 1 mm,
— Диаметър на чашата в най-широката част .....	70 mm ± 1 mm,
— Диаметър на основата .....	35 mm ± 1 mm,
— Дебелина на стъклото при стените .....	1,5 mm ± 0,2 mm,
— Дебелина на стъклото при основата .....	5 mm ± 1 mm.

Всяка чаша е съоръжена с часовниково стъкло, чийто диаметър е 10 mm по-широк от отвора на чашата. Часовниковото стъкло се използва като покритие, за да се избегне загубата на аромат и запрашаването.

#### 2.2. Производствени характеристики

Чашата се изработва от устойчиво стъкло; тя е тъмно оцветена, за да не се различава цвета на съдържанието ѝ и не трябва стъклото да е издраскано или да има мехурчета по него.

Ръбът трябва да е равен, гладък и снабден с фланец.

Стъклото трябва да е закалено, за да издържа на температурните промени, на които ще бъде подложено по време на тестовете.

### 2.3. Указания за употреба

Чашите се почистват с неароматизиран сапун или перилен препарат и се изплакват многократно до пълното отстраняване на почистващото средство. Последното изплакване се прави с дестилирана вода, след което чашите се оставят за отцеждане и се сушат в сушилня.

Не се използват нито концентрирани киселини, нито хромови киселинни смеси.

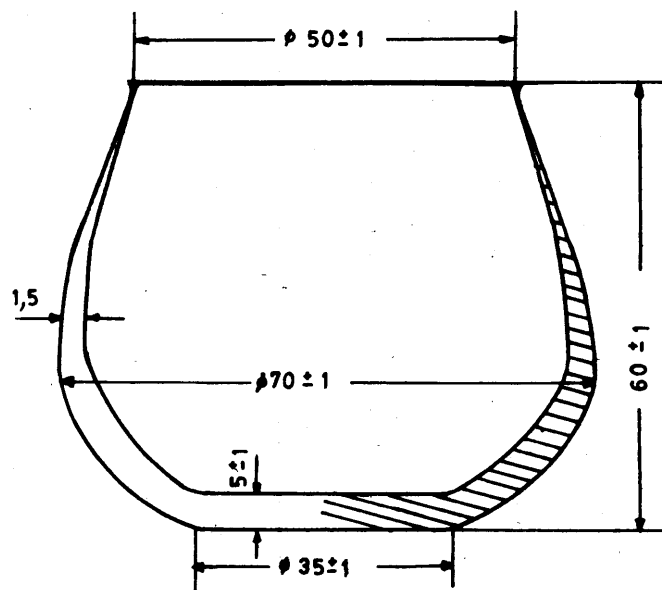
Чашите се държат в сушилнята, докато използването им стане необходимо, или се държат в бюфет, в който са защитени от замърсяване с всякакви външни миризми.

Преди използване всяка чаша се помирихва, за да е сигурно, че отсъстват външни миризми. При подготвяне на теста се подсигурива записването на легендата на всяка чаша и маслиновото масло, което се съдържа в нея. Организаторът на теста е единственият, запознат с отношението легенда/маслиново масло.

### 3. НАГРЕВАТЕЛНО УСТРОЙСТВО ЗА ПОДГРЯВАНЕ НА МОСТРИТЕ

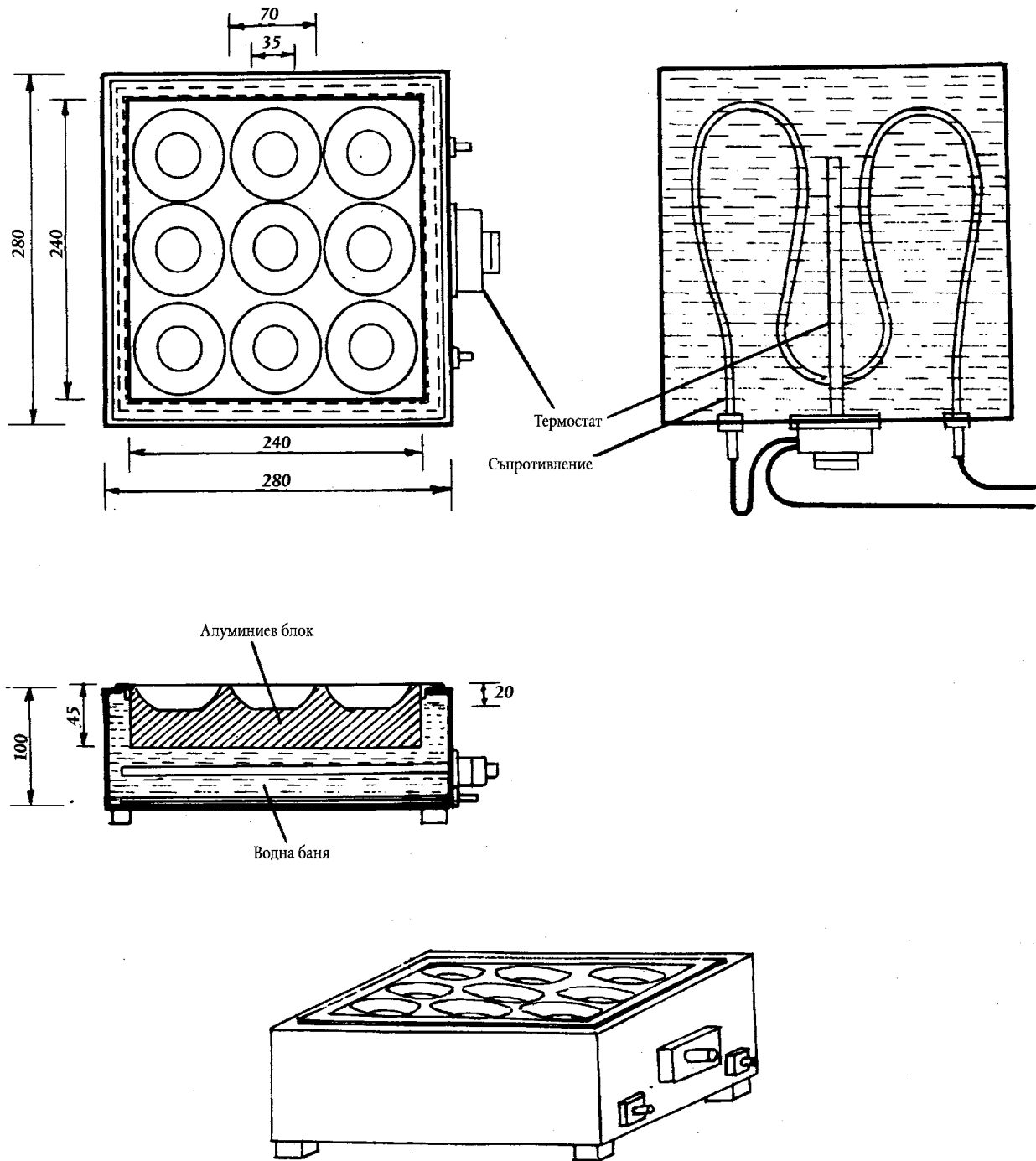
Органолептичните признаци на мострите се разглеждат при определена температура, която за маслиновото масло е  $28 \pm 2$  °C. За целта във всяка cabina се инсталира нагревателно съоръжение, което да е на разположение на дегустатора. То се състои от алуминиев блок, потопен в термостатично контролирана водна баня за поддържане на постоянна температура. Върху блока има поредица вдлъбнатини, в които се поставят дъната на чашите. Температурната разлика между нагревателния уред и маслиновото масло в чашите, поставени във вдлъбнатините на отделните блокове, не трябва да е повече от  $\pm 2$  °C.

Фигура 1 — Чаша за дегустация



Размери (в mm)

Фигура 2 — Устройство за подгряване на лострите (размери в милиметри)



**РЪКОВОДСТВО ЗА ОБОРУДВАНЕТО НА ПОМЕЩЕНИЕ ЗА ТЕСТОВЕ****1. ВЪВЕДЕНИЕ**

Помещението за тестове е предназначено да осигури на групата, участваща в сетивните тестове, подходяща, удобна, стандартна среда, която улеснява работата и спомага за подобряване повторемостта и възпроизводимостта на резултатите.

**2. ОБХВАТ**

Целта на настоящия стандарт е да уточни основните условия, които трябва да се удовлетворят при оборудването на помещение за тестове.

**3. ОБЩИ СПЕЦИФИКАЦИИ ЗА ОБОРУДВАНЕТО**

Помещенията, независимо от размера им (вж. 3.1.), отговарят на следните спецификации:

Трябва да са приятни и подходящо осветени (вж. 3.2.), но в неутрален стил. За целта се препоръчва лек, прост, светъл цвят за стените с оглед създаването на спокойна атмосфера <sup>(1)</sup>.

Помещенията трябва да са лесни за почистване и трябва да са отделени от източници на шумове; поради това за предпочитане е да са шумоизолирани. Трябва да не се допускат външни миризми, като за целта, ако е възможно, трябва да са снабдени с ефективно вентилационно съоръжение. Ако колебанията на околната температура го изискват, помещението за тестове трябва да се оборудва с климатик, за да се поддържа температура от 20—22 °С.

**3.1. Размери**

Размерите на помещенията често зависят от възможностите на лабораториите или фирмите. Обикновено трябва да са достатъчно обширни, за да позволят инсталирането на 10 кабинни и зона за подготовка на мострите.

Все пак по-добре е зоната, отделена за инсталиране, да е по-голяма, тъй като в такъв случай може да се осигурят допълнителни зони, например за почистване на апаратурата, подготвяне на кулинарни продукти и събирането на групите.

**3.2. Осветление**

Общото осветление, естествено или изкуствено (например луминесцентно), трябва да е еднакво, с разпръсната светлина и да подлежи на контрол.

**3.3. Температура и хидрометрични условия**

В помещенията трябва постоянно да се поддържа приятна температура и хидрометрични условия. Освен в особени случаи се препоръчва температура от 20 до 22 °С и хидрометрични условия от 60 до 70 % относителна влажност.

**4. ОПИСАНИЕ НА КАБИНИТЕ****4.1. Обща характеристика**

Кабините за сетивен анализ се разполагат една до друга по дължина в рамките на помещението. Те трябва да са еднакви и да са разделени с прегради, които да са достатъчно високи и широки, за да изолират дегустаторите, когато заемат местата си.

Кабините могат да са направени от всякакъв подходящ материал, който се почиства и поддържа лесно (например дърво, плексиглас, ПДЧ и пр.). Ако се използва боя, трябва да е напълно обезмиришена, когато изсъхне.

Местата за сядане в кабините трябва да са удобни и да се регулират във височина.

Във всяка кабина трябва да се осигури индивидуално осветление, което да се регулира по посока и сила.

Силно се препоръчва кабините да са снабдени с бутон, свързан с външна крушка, която дава възможност на дегустатора да сигнализира на служителя навън, че е привършил теста, иска допълнителни мостри, липсва му определена апаратура, забелязал е нередност или иска информация и т.н., без да се разсейват останалите дегустатори.

<sup>(1)</sup> Цветовата гама на стаята и осветлението могат да повлияят на резултатите от сетивния анализ.

#### 4.2. **Размери**

Кабините трябва да са достатъчно широки и удобни. Обикновено те имат следните размери:

— ширина:

0,75 m (без мивка)

0,85 m (с мивка);

— дължина:

0,5 m (маса)

0,2 m излишък за поставянето на преграда;

— височина на преградите:

0,6 m минимум от масата;

— височина на масата:

0,75 m.

#### 4.3. **Подредба**

Повърхността на масата трябва да се почиства лесно.

Част от повърхността се използва за поставянето на умивалник с течаша питейна вода. Ако обаче това е невъзможно, пространството може да се използва за поставянето на поднос, плювалник или подобно съоръжение.

Ако мострите по време на теста трябва да бъдат с постоянна температура, която е над или под стайната, е целесъобразно да бъде осигурен съответен за целта уред (водна баня, котлон и пр.).

На височина от около 1,10 m от пода може да се постави лавица за подреждането на различни помощни средства (чаши, малко по размер оборудване и т.н.).

Ако подредбата на кабините в помещението за тестове го позволява, би било полезно да се инсталира съоръжение за улесняване представянето на мострите. То може да бъде шубер-плъзгач (фигура 1), въртящо вертикално съоръжение (фигура 2), подходящо за стъклени или порцеланови чаши (високи кутии) или шубер с хоризонтално отваряне, ако кутиите за мострите са малки по размери (фигура 3). Основният въпрос е отворът да е достатъчно голям, за да позволява подаването на подноса и чашите, съдържащи мострите.

Виж фигура 4, където е представена примерна подредба на помещение за провеждане на тестове и на помощни помещения.

#### 5. **ПОМОЩНИ ПОМЕЩЕНИЯ**

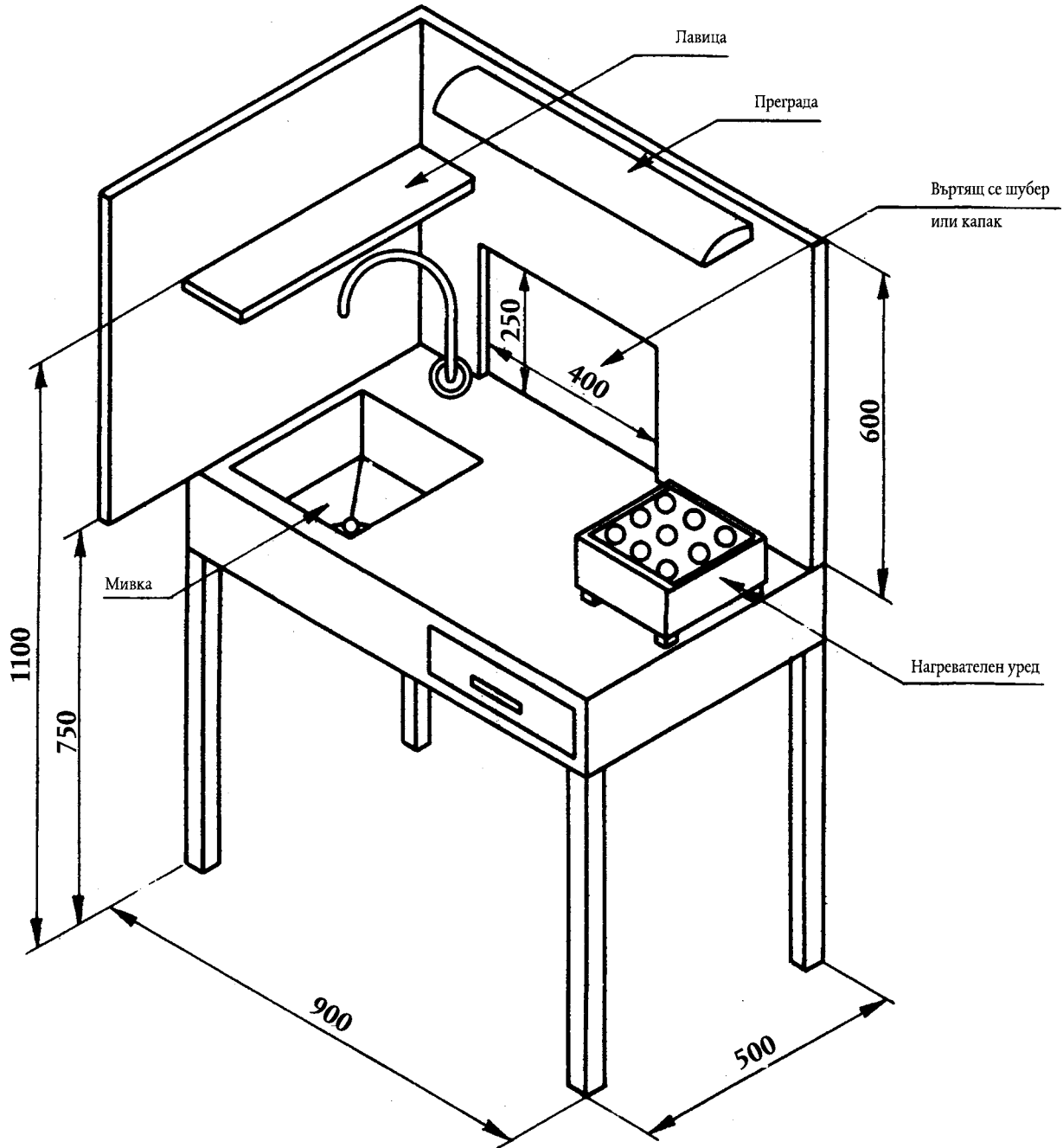
Ако има достатъчно пространство, се препоръчва да се осигурят отделни помещения за подготвянето на мострите (кулинарни или други), за подреждането на чаши или апаратура и провеждането на разговори преди или след тестовете. Ако има такива помещения, те трябва да се поддържат чисти; по никакъв начин каквито и да било миризми, шум или разговори от тези помещения не трябва да смущават работата на оценителите в помещението за провеждане на тестове.

**Бележки:** Описани са идеалните условия. Все пак ако не е възможно да се подсури наличието на подобна подредба единствено за целите на сетивните анализи, тестовете могат да се провеждат в помещения, които отговарят на минималните изисквания (за осветление, температура, шум, миризми), като се монтират преносими кабинни, съставени от съвместими елементи, така че поне дегустаторите да са отделени един от друг.



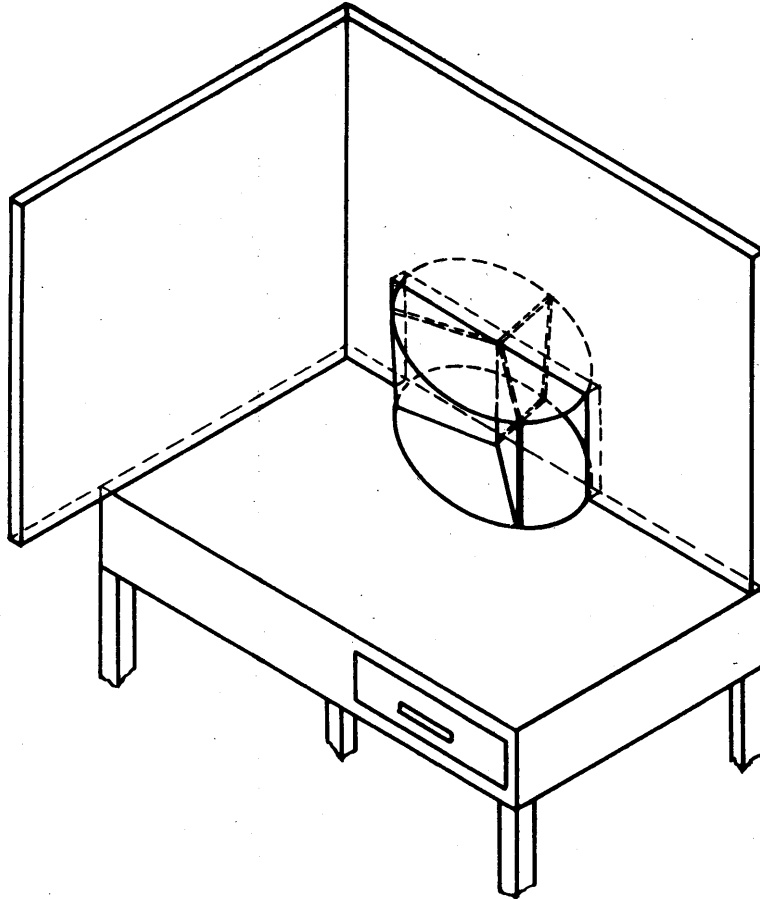
ПОДРЕДБА НА КАБИНАТА

Фигура 1



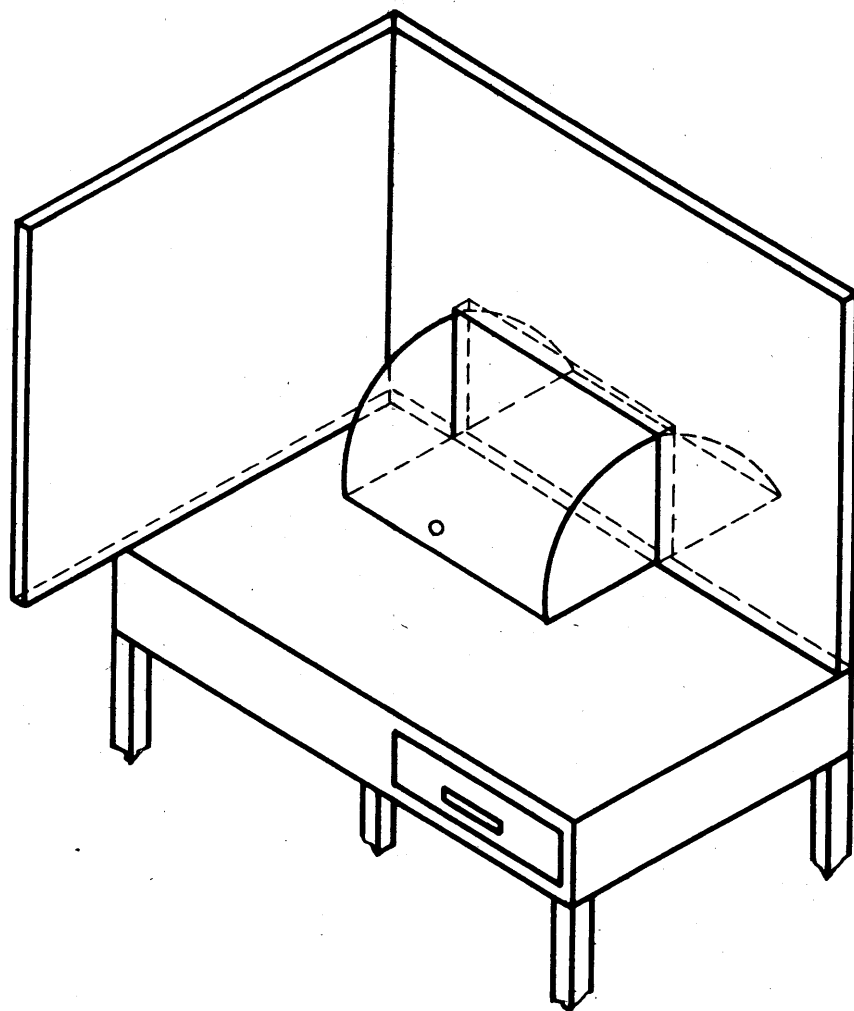
## ВЪРТЯЩО СЕ СЪОРЪЖЕНИЕ ЗА ПОДАВАНЕ НА МОСТРИ

Фигура 2



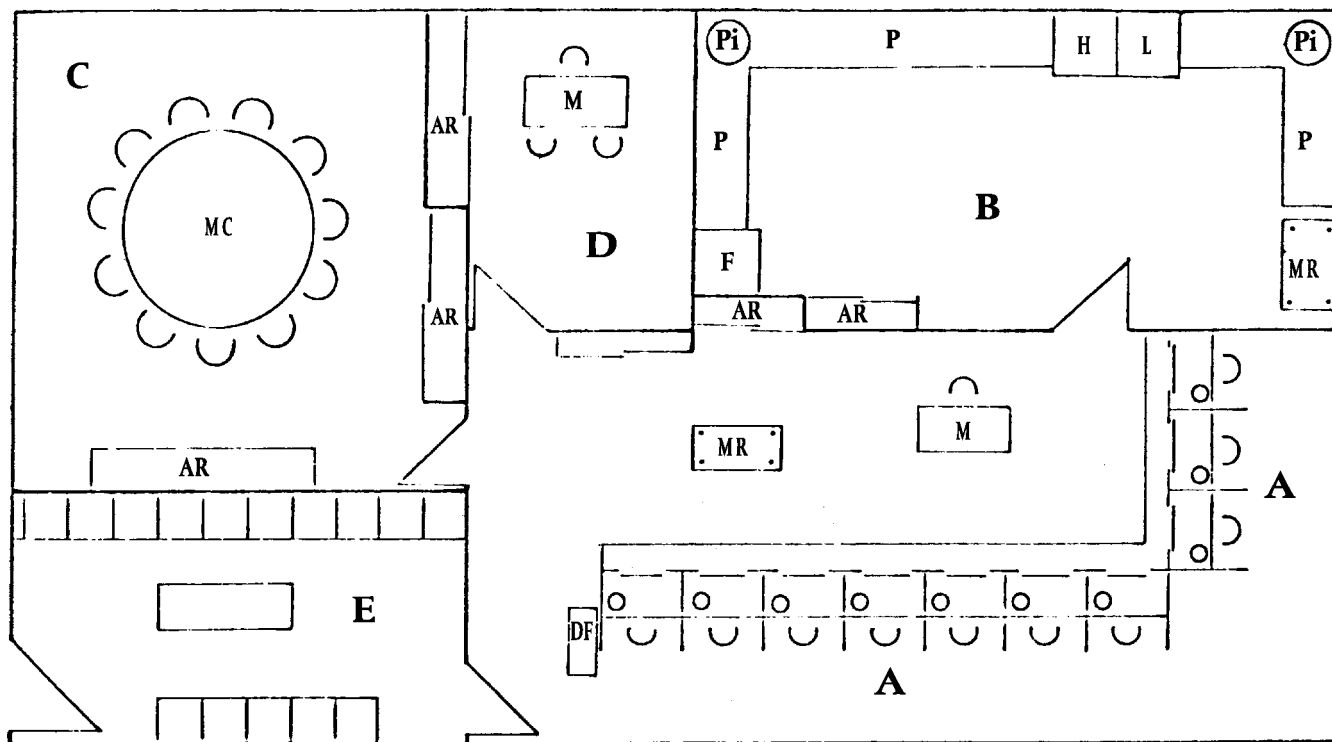
## КАПАК ЗА ПОДАВАНЕ НА МОСТРИ

Фигура 3



## ЛАБОРАТОРИЯ ЗА СЕТИВЕН АНАЛИЗ (Примерна подредба)

Фигура 4 — Пример за подредбата на помещението за провеждане на тестове



- A: кабини за дегустация,  
 B: помещение за почистване на апаратурата и подготвяне на мострите,  
 C: помещение за заседания на групата,  
 D: канцелария,  
 E: чакалня,  
 F: хладилник,  
 H: фурна,  
 L: машина за миене на съдове,  
 Pi: умивалник,  
 AR: бюфет,  
 MR: количка,  
 DF: раздаване на формуляри,  
 MC: кръгла маса,  
 P: работна повърхност.

## ПРИЛОЖЕНИЕ XIII

## ДОКАЗВАНЕ НА ИЗВЪРШЕНО РАФИНИРАНЕ

## 1. НЕУТРАЛИЗИРАНЕ И ОБЕЗЦВЕТЯВАНЕ НА МАСЛИНОВО МАСЛО В ЛАБОРАТОРИЯТА

## 1.1. Неутрализация на маслото

## 1.1.1. Апаратура

- мензура, 300 ml, висока,
- лабораторна центрофуга с 100-милилитрови епруветки,
- мензура, 250 ml,
- колба с кръгло дъно, 100 ml,
- разделителна фуния, 1 литър.

## 1.1.2. Реактиви

- воден разтвор на 12 % натриев хидроксид,
- разтвор в етилов алкохол на 1 % фенолфталеин,
- чист хексан, AR,
- чист пропан-2-ол с AR.

## 1.1.3. Ход на опита

- а) *Масла със съдържание на свободни мастни киселини, изразено в олеинова киселина, по-малко от 30 %*

Поставят се 50 g сурово масло във висока 300-милилитрова мензура и се нагреват до 65 °C на водна баня. Добавя се такова количество 12 % разтвор на натриев хидроксид, което съответства на свободната киселина в маслото, и е с 5 % повече, като се разбърква внимателно през цялото време. Разбъркването продължава пет минути, като температурата се поддържа в рамките на 65 °C.

Сместа се пренася в 100-милилитровите центрофужни епруветки и сапунената паста се отделя чрез центрофугиране. Декантираното масло се излива в 250-милилитрова мензура и се промива с 50 до 60 ml вряща дестилирана вода, като водата се отстранява чрез сифон. Промиванията се повтарят до отстраняването на всички следи от остатъчен сапун (изчезване на розовия цвят на фенолфталеина).

Центрофугира се маслото за отстраняване на каквито и да било малки количества остатъчна вода.

- б) *Масла със съдържание на свободни мастни киселини, изразено в олеинова киселина, по-голямо от 30 %*

В еднолитрова разделителна фуния се поставят 50 g сурово масло, 200 ml хексан, 100 ml пропан-2-ол и такова количество 12 % разтвор на натриев хидроксид, което съответства на свободната киселина в маслото, и е с 0,3 % в повече.

Разбърква се енергично в продължение на една минута. Добавят се 100 ml дестилирана вода, разбърква се отново и се оставя да престои.

След разделянето на слоевете, се оставя долният слой, съдържащ сапуните, да се оттече. Между двата слоя (маслен отгоре и воден отдолу) често се образува междинен слой съставен от слиз и неразтворими вещества, които също трябва да се отстранят.

## 1.2. Обезцветяване на неутрализираното масло

## 1.2.1. Апаратура

- колба с кръгло дъно, 250 ml, с три шлифовани стъклени гърла за монтирането на:
  - а) термометър, градуиран в градуси, и позволяващ отчитането да се извършва при 90 °C;
  - б) механична бъркалка, извършваща 250 до 300 оборота в минута, съоръжена за работа под вакуум;
  - в) връзка към вакуумната помпа,
- вакуумна помпа, с манометър, с възможност за отчитане на остатъчно налягане от 15 до 30 милибара.

## 1.2.2. Ход на опита

Претеглят се около 100 г от неутрализираното масло в колбата с три гърла. Поставят се термометърът и бъркалката, свързват се с вакуумната помпа и се нагрява до 90 °С, като се разбърква през цялото време. Поддържа се тази температура, като се продължава разбъркването, докато маслото, което ще се анализира, не се освободи напълно от водата (около 30 минути). След това вакуумът се нарушава и се добавят 2 до 3 g активирана пръст.

Вакуумът се възстановява до постигането на остатъчно налягане от 15 до 30 милибара и при поддържането на температура от 90 °С се разбърква около 30 минути при около 250 оборота в минута.

Филтрира се, докато е още горещо в термостатична пещ (50 до 60 °С).

---

## ПРИЛОЖЕНИЕ XIV

## ДОПЪЛНИТЕЛНИ БЕЛЕЖКИ 2,3 И 4 КЪМ ГЛАВА 15 НА КОМБИНИРАНАТА НОМЕНКЛАТУРА

1. „Бележка 2 А: За целите на кодове 1509 и 1510 от КН, „маслиново масло“ означава масла, добити само от обработката на маслини, с изключение на реестрифицираното маслиново масло и смесите на маслиново масло с други масла.

Наличието на реестрифицирано маслиново масло или други масла се доказва чрез използването на методите, установени в приложения V, VII, IX, X и XII. Аналитичните характеристики на стероловия и киселинен състав на всички маслинови масла съгласно кодове 1509 и 1510 от КН са установени в долната таблица.

Таблица I — Киселинен състав като проценти от общия сбор		Таблица II — Стеролев състав като проценти от общия сбор	
Миристинова киселина	M 0,1	Хлорестерол	M 0,5
Линоленова киселина	M 0,9	Брасикастерол	M 0,2
Арахидонова киселина	M 0,7	Кампестерол	M 4,0
Ейкозаноева киселина	M 0,5	Стигмастерол	< кампестерола
Бехенова киселина	M 0,3	Бетаситостерол <sup>(1)</sup>	m 93,0
Лигноцеровна киселина	M 0,5	Δ 7-стигмастерол	M 0,5

<sup>(1)</sup> Делта-5-23 Стигмастерол + Холестерол + Бетаситостерол + Ситостанол + Делта-5-Авенастерол + Делта-5-24-Стигмастациенол.m = Mмаксимумmминимум

Бележка 2 В: „Студено пресовано маслиново масло“ означава масло, добито единствено от маслини чрез използването на механични или други физични средства в условия, и по-специално, термични условия, които не водят до увреждане на маслото и които не са претърпели друга обработка освен промиване, декантиране, центрофугиране или филтриране, с изключение на маслата, извлечени от маслини чрез използването на разтворители (1510) и определени в раздели I и II по-долу.

1. За целите на подпозиция 1509 10 10, „студено пресовано маслиново масло за осветление“, независимо от неговата киселинност, означава маслиново масло с:

- a) съдържание на алифатни алкохоли, което не превишава 400 mg/kg;
- b) съдържание на еритродиол и уваол, което не превишава 4,5 %;
- v) съдържание на наситени мастни киселини на второ място в триглицеридите, което не превишава 1,3 %, и/или
- г) една от следните характеристики:
  - (d1) пероксисно число, превишаващо 20 meq O<sub>2</sub>/kg;
  - (d2) съдържание на летливи халогенирани разтворители, надхвърлящо като цяло 0,2 mg/kg или превишаващо 0,1 mg/kg за всеки отделен разтворител;
  - (d3) коефициент на екстинкция K<sub>270</sub> (100) по-висок от 0,250 и не по-висок от 0,11 след третиране с активиран диалуминиев триоксид. Някои масла, които имат съдържание на свободни мастни киселини, изразено като олеинова киселина, от 3,3 g на 100 g след пасиране през активиран диалуминиев триоксид, в съответствие с метода, изложен в приложение XV, могат да имат коефициент на екстинкция K<sub>270</sub> по-висок от 0,11. Ако е така, след неутрализация и обезцветяване в лабораторията, те трябва да имат следните характеристики:

- коефициент на екстинкция  $K_{270}$  не по-висок от 1,20;
  - вариране на коефициента на екстинкция ( $\Delta K$ ) <sup>(1)</sup> по-висок от 0,01, но не по-висок от 0,16;
  - (d4) органолептични характеристики, които включват различни недостатъци, превишаващи границите за допустимост и оценка от дегустацията на комисията по-ниска от 3,5.
- II. За целите на подпозиция 1509 10 90, „студенопресовано“ маслиново масло означава маслиновомасло, имащо следните характеристики:
- а) киселинно съдържание, изразено като олеинова киселина, което не превишава 3,3 g на 100 g;
  - б) перокисно число, което не превишава 20 meq O<sub>2</sub>/kg;
  - в) съдържание на алифатни алкохоли, което не превишава 300 mg/kg;
  - г) съдържание на летливи халогенирани разтворители, което като цяло не надхвърля 0,2 mg/kg и не превишава 0,1 mg/kg за всеки отделен разтворител;
  - д) коефициент на екстинкция  $K_{270}$  не по-висок от 0,250 и не по-висок от 0,10 <sup>(2)</sup> след третиране на маслото с активиран диалуминиев триоксид ;
  - е) вариране на коефициента на екстинкция ( $\Delta K$ ), в областта на 270 nm, не по-високо от 0,010;
  - ж) органолептични характеристики, които могат да включват различни недостатъци в границите за допустимост и оценка от дегустацията на комисията по-висока от 3,5;
  - з) съдържание на еритродиол и уваол, което не превишава 4,5 %;
  - и) съдържание на наситени мастни киселини на второ място в триглицеридите, което не превишава 1,3 %.

**Бележка 2 С:** Подпозиция 1509 90 00 покрива маслиновото масло, добито при обработката на маслинови масла, попадащи в подпозиция 1509 10 10 или 1509 10 90, било то смесено или не със студенопресовано маслиново масло, което има следните характеристики:

- а) киселинно съдържание, изразено като олеинова киселина, което не превишава 3,3 g на 100 g;
- б) съдържание на алифатни алкохоли, което не превишава 350 mg/kg;
- в) коефициент на екстинкция  $K_{270}$  (100) по-висок от 0,250 и не по-висок от 1,20, който след третиране на пробата с активиран диалуминиев триоксид, е не по-висок от 0,10 ;
- г) вариране на коефициента на екстинкция ( $\Delta K$ ), в областта на 270 nm, по-високо от 0,010 и не по-високо от 0,160;
- д) съдържание на еритродиол и уваол, което не превишава 4,5 %;
- е) съдържание на наситени мастни киселини на второ място в триглицеридите, което не превишава 1,5 %.

**Бележка 2 D:** За целите на подпозиция 1510 00 10, „сурови масла“ означава масла, особено остатъчно маслиново масло, със следните характеристики:

- а) киселинно съдържание, изразено като олеинова киселина, по-голямо от 2 g на 100 g;
- б) съдържание на еритродиол и уваол, което превишава 12 %;
- в) съдържание на наситени мастни киселини на второ място в триглицеридите, което не превишава 1,8 %.

**Бележка 2 E:** Маслата, попадащи в подпозиция 1510 00 90, включват маслата, добити чрез обработката на маслата, попадащи в подпозиция 1510 00 10, било то смесени или не със студенопресовано маслиново масло, които нямат характеристиките на маслата, упоменати в точки I и II, като е предвидено те да имат съдържание на наситени мастни киселини на второ място в триглицеридите, което не превишава 2 %.

<sup>(1)</sup>  $(K = K_m - 0,5 (K_{m-4} + K_{m+4}))$

$K_m$  означава коефициентът на екстинкция при дължина на вълната на върха на абсорбционната крива в областта на 270 nm.

$K_{m-4}$  и  $K_{m+4}$  означават коефициентът на екстинкция при дължини на вълната с 4 nm по-ниски и по-високи от дължината на вълната на  $K_m$ .

<sup>(2)</sup> Ако  $K_{270}$  превишава 0,25, следва да се извърши нов опит след пасиране върху диалуминиев триоксид.  $K_{270}$  може да не надвишава 0,10.



2. „Бележка 3: Подзаглавия 1522 00 31 и 1522 00 39 не покриват:
- а) утайки, получени при обработката на мастни вещества, и съдържащи масло, имащо йодно число, определено в съответствие с метода, изложен в приложение XVI, по-ниско от 70 или по-високо от 100;
  - б) утайки, получени при обработката на мастни вещества, и съдържащи масло, имащо йодно число по-ниско от 70 или по-високо от 100, на които лицето на пика, представляващ обема на задържане на ситостерола, определен в съответствие с допълнението към регламента, споменат в допълнителната бележка 4, е по-малко от 93 % от сбора на лицата на пиковите на стеролите.“
3. „Бележка 4: Аналитичните методи за определяне на характеристиките на продуктите, упоменати по-горе, са тези, установени в приложенията към Регламент (ЕИО) 2568/91.“
-

## 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 °С,
- пещ с електрическо подгряване, снабдена с термостатично устройство, регулирано до  $103 \pm 2$  °С, 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 почистена 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 смилва 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 запушва 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 °С с оглед на намаляването на съдържанието на влага и летливи вещества до по-малко от 10 %.

## 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  $103 \pm 2$  °С и след това охладена в десикатор за не по-малко от един час.

## 2.6. Първоначална екстракция

В апарата за екстракция се поставя гилзата (или филтърната хартия), съдържаща частта от пробата. Налива се в колбата необходимото количество хексан. Свързва се колбата с апарата за екстракция и цялата система се поставя в банята с електрическо подгряване. Настройва се скоростта на подгряване по такъв начин, че скоростта на оросяване да не е по-малка от три капки за секунда (средно, не силно кипене). След екстракция в продължение на четири часа, се оставя да се охладят. 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

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

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

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

### 2.8. Премахване на разтворителя и претегляне на екстракта

По-голямата част от разтворителя се премахва чрез дестилация в баня с електрическо подгряване. Последните следи от разтворителя се премахват чрез нагряване на колбата в пещта при  $103 \pm 2$  °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.

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

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

Провеждат се дублиращи определяния на опитната проба.

## 3. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

### 3.1. Метод за изчисляване и формула

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

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

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. Повторяемост

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

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

## ПРИЛОЖЕНИЕ XVI

## ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЙОДНОТО ЧИСЛО

## 1. ОБХВАТ

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

## 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

За целите на Международния стандарт се прилага следното определение:

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

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

## 3. ПРИНЦИП

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

## 4. РЕАКТИВИ

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

4.1. *вода*, в съответствие с изискванията на ISO 3696, Качество 3.4.2. *калиев йодид*, разтвор от 100 g/l, който не съдържа йодат или свободен йод.4.3. *скорбяла*, разтвор.

Смесват се 5 g разтворима скорбяла с 30 ml вода, тази смес се прибавя към 1000 ml кипяща вода, вари се в продължение на три минути и се оставя да се охлади.

4.4. *натриев тиосулфат*, стандартен волуметричен разтвор  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$ , 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

Тепло 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 натриев трифосфат (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

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

където:

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

$V_1$  = е цифровата стойност на обема, в милилитри, на стандартния обемен натриев трифосфатен разтвор (4.4.), използван за празната проба.

$V_2$  = 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 повторемост (9.2.) е спазено.