РЕГЛАМЕНТ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ (ЕС) 2019/1604 НА КОМИСИЯТА

от 27 септември 2019 година

за изменение на Регламент (ЕИО) № 2568/91 относно характеристиките на маслиновото масло и маслиновото масло от остатъчен материал и съответните методи за анализ

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

като взе предвид Регламент (ЕС) № 1308/2013 на Европейския парламент и на Съвета от 17 декември 2013 година за установяване на обща организация на пазарите на селскостопански продукти и за отмяна на регламенти (ЕИО) № 922/72, (ЕИО) № 234/79, (ЕО) № 1037/2001 и (ЕО) № 1234/2007 ([1]), и по-специално член 91, параграф 1, буква г) от него,

като има предвид, че:

(1) В Регламент (ЕИО) № 2568/91 на Комисията ([2]) се определят физикохимичните и органолептичните характеристики на маслиновото масло и маслиновото масло от остатъчен материал, както и методите за оценка на тези характеристики.

(2) Тези методи и пределните стойности, отнасящи се до характеристиките на маслото, се актуализират редовно, като се вземат предвид както становищата на експертите в областта на химията, така и дейностите, проведени в рамките на Международния съвет за маслиновите продукти (МСМП).

(3) С цел да се осигури изпълнението, на равнището на Съюза, на най-новите международни стандарти, установени от МСМП, следва да се актуализират някои методи за анализ, определени в Регламент (ЕИО) № 2568/91.

(4) Търговският стандарт на МСМП бе изменен по отношение на изразяването на границите на свободната киселинност, пероксидното число, органолептичния анализ (медиана на недостатъка и медиана на признака „плодов аромат“) и разликата между ECN42 (ВЕТХ) и ECN42 (теоретично изчисление) с цел последователност със стойностите за прецизност на аналитичния метод.

(5) Съгласно член 2а, параграф 5 от Регламент (ЕИО) № 2568/91 държавите членки следва да проверят дали пробата от маслиново масло отговаря на декларираната категория, като проверят характеристиките, предвидени в приложение I към посочения регламент независимо в каквапоследователност или като следват реда, посочен в схемата за вземане на решения съгласно приложение Iб към него.

(6) С оглед на неотдавнашните промени е целесъобразно да се актуализират таблиците в приложение Iб към Регламент (ЕИО) № 2568/91 и допълнението към него, както е уместно. Също така е ясно, че терминът „диаграма“ е по-подходящ от термина „схема на решенията“ с оглед на съдържанието на приложение Iб.

(7) Точка 9.4 от приложение XII към Регламент (ЕИО) № 2568/91 определя медианата на недостатъците като медианата на недостатъка, който се възприема с най-висок интензитет. В контекста на насрещни оценки и в случай че различни групи трябва да оценят съответствието на маслото, следва да с поясни, че решението, свързано със съответствието на характеристиките на дадено масло с декларираната категория, се свързва единствено със стойността на медианата на основния недостатък, независимо от неговото естество.

(8) Поради това Регламент (ЕИО) № 2568/91 следва да бъде съответно изменен.

(9) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Комитета за общата организация на селскостопанските пазари,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

Член 1

Регламент (ЕИО) № 2568/91 се изменя, както следва:

(1) Член 2 се изменя, както следва:

а) в параграф 1 буква л) се заменя със следното:

„л) за определяне на компонентния състав и съдържанието на стероли и за определяне на алкохолни съединения се използва газова хроматография с капилярна колона и методът, описан в приложение XIX“;

([1]) ОВ L 347, 20.12.2013 г., стр. 671.

([2]) Регламент (ЕИО) № 2568/91 на Комисията от 11 юли 1991 година относно характеристиките на маслиновото масло и маслиновото масло от остатъчен материал и съответните методи за анализ (ОВ L 248, 5.9.1991 г., стр. 1).

б) в параграф 2 третата алинея се заменя със следното:

„Ако групата не потвърди декларираната категория по отношение на органолептичните характеристики, при поискване от заинтересованата страна националните органи или техни представители своевременно организират две насрещни оценки, които се извършват от други одобрени групи дегустатори. Поне една от тези оценки се извършва от одобрена от засегнатата държава членка производител група дегустатори. Ако декларираното класифициране бъде потвърдено при най-малко две от насрещните оценки, съответните характеристики се приемат за отговарящи на декларираните. Ако случаят не е такъв, независимо от вида недостатъци, определени по време на насрещните оценки, класифицирането се обявява за несъответстващо на характеристиките и заинтересованата страна поема отговорност за разходите за насрещните оценки.“;

(2) в член 2а, параграф 5 буква б) се заменя със следното:

„б) като следват посочения в приложение Iб ред в съответствие с диаграмата, докато бъде достигнато някое от решенията, съдържащи се в диаграмата.“;

(3) таблицата „ПРИЛОЖЕНИЯ Съдържание“ се заменя с таблицата от приложение I към настоящия регламент;

(4) Приложение I се заменя с текста в приложение II към настоящия регламент;

(5) точка 2.1 от приложение Iа се заменя със следното:

„2.1. Всяка първична проба трябва да се подразделя на лабораторни проби в съответствие с точка 2.5 от стандарт EN ISO 5555 и да се анализира съобразно реда, показан в съдържащата се в приложение Iб диаграма, или по всеки друг начин на случаен принцип.“;

(6) приложение Iб се заменя с текста в приложение III към настоящия регламент;

(7) приложение V се заличава;

(8) в приложение VII точка 4.2 се заменя със следното:

„4.2. n-хексан (хроматографска чистота). Хексанът може да бъде заменен с изооктан (2,2,4-триметилпентан с хроматографска чистота), при условие че са постигнати сравними стойности за прецизност.“;

(9) приложение XII се изменя в съответствие с приложение IV към настоящия регламент;

(10) приложение XVII се изменя в съответствие с приложение V към настоящия регламент;

(11) приложение XVIII се изменя в съответствие с приложение VI към настоящия регламент;

(12) приложение XIX се заменя с текста в приложение VII към настоящия регламент;

(13) в приложение XX точка 4.2 се заменя със следното:

„4.2. n-хексан, хроматографска чистота или чистота за остатък. Хексанът може да бъде заменен с изооктан (2,2,4-триметилпентан с хроматографска чистота), при условие че са постигнати сравними стойности за прецизност. Разтворителите с точка на кипене, по-висока от тази на n-хексан, имат нужда от повече време, за да се изпарят Те обаче се предпочитат поради токсичността на хексана. Чистотата трябва да бъде проверена; например трябва да се извърши контрол на остатъчния материал след изпаряване на 100 ml разтворител.

ВНИМАНИЕ — пàрите са запалими. Да се държи настрани от източници на топлина, искри или открит пламък. Да се гарантира, че бутилките са винаги добре затворени. При употреба да се осигури подходяща вентилация. Да се избягва натрупването на пàри и да се отстранят всички възможни причинители на пожар, като нагреватели или електрически уреди, които не са произведени от незапалим материал. Опасен е при вдишване, тъй като може да причини увреждане на нервните клетки. Да се избягва вдишване на пàрите. Ако е необходимо, да се използва подходящ апарат за дишане. Да се избягва контакт с очите и кожата.

Изооктанът е запалима течност, създаваща опасност от пожар. Границите на взривяемост във въздуха са от 1,1 % до 6,0 % (обемна част). Токсичен е при поглъщане и вдишване. За работа с този разтворител да се използва комин с вентилатор в добро експлоатационно състояние.“

Член 2

Настоящият регламент влиза в сила на двадесетия ден след деня на публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

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

Съставено в Брюксел на 27 септември 2019 година.

За Комисията

Председател

Jean-Claude JUNCKER

ПРИЛОЖЕНИЕ I

„ПРИЛОЖЕНИЯ

РЕЗЮМЕ

Приложение I	Характеристики на видовете маслиново масло
Приложение Ia	Вземане на проби от маслиново масло или маслиново масло от остатъчен материал, доставяни в директни опаковки
Приложение Iб	Диаграма за проверка на съвместимостта на пробата от маслиново масло с декларираната категория
Приложение II	Определяне на свободни мастни киселини, студен метод
Приложение III	Определяне на пероксидното число
Приложение IV	Определяне на съдържанието на восъци чрез газова хроматография с капилярна колона
Приложение VII	Определяне на процентното съдържание на 2-глицерилмонопалмитат
Приложение IX	Спектрофотометрично изследване в ултравиолетовия спектър
Приложение X	Определяне на метилови естери на мастни киселини чрез газова хроматография
Приложение XI	Определяне на летливите халогенирани разтворители на маслиновото масло
Приложение XII	Метод за органолептична оценка на необработено маслиново масло на Международния съвет за маслиновите продукти (МСМП)
Приложение XV	Маслено съдържание на остатъчния материал
Приложение XVI	Определяне на стойността на йодното число
Приложение XVII	Метод за определяне на стигмастадиени в растителни масла
Приложение XVIII	Определяне на разликата между действителното и теоретичното съдържание на триацилглицеролите с ECN 42
Приложение XIX	Определяне на стеролния състав и съдържание и на алкохолните съединения чрез капилярна газова хроматография
Приложение XX	Метод за определяне на съдържанието на восъци, метилови естери на мастни киселини и етилови естери на мастни киселини чрез капилярна газова хроматография
Приложение XXI	Резултати от проверките за съответствие, извършени по отношение на маслиновите масла, посочени в член 8, параграф 2“

ПРИЛОЖЕНИЕ II

„ПРИЛОЖЕНИЕ I

ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ВИДОВЕТЕ МАСЛИНОВО МАСЛО

Характеристики на качеството

Категория	Киселинност (%) (*)	Пероксидно число (mEq O_2/kg)	K_{232}	K_{268} или K_{270}	Делта-K	Органолептична оценка		Етилови естери на мастни киселини (mg/kg)
						Медиана на недостатъците (Md) (*)	Медиана на признака „плодов аромат“(Mf)	
1. Необработено маслиново масло екстра качество	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Необработено маслиново масло	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Маслиново масло за осветление	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (1)	—	—
4. Рафинирано маслиново масло	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Маслиново масло, съставено от рафинирано масло и необработени маслинови масла	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Нерафинирано маслиново масло от остатъчен материал	—	—	—	—	—		—	—
7. Рафинирано маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Маслиново масло от остатъчен материал	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(1) Медианата на недостатъците може да е по-малка или равна на 3,5, когато медианата на признака „плодов аромат“ е равна на 0,0.

Характеристики за чистота

Категория	Съдържание на мастни киселини (1)						Общо количество трансолеинови изомери (%)	Общо кол. транслиноловi + транслиноленови изомери (%)	Стигмастадиени (mg/kg) (2)	Разлика: ECN42 (BETX) и ECN42 (теоретично изчисление)	2-глицерилмонопалмитат (%)
	Миристинова (%)	Линоленова (%)	Арахинова (%)	Ейкозенова (%)	Бехенова (%)	Лигноцеринова (%)					
1. Необработено маслиново масло екстра качество	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, ако сумарният % палмитинова киселина ≤ 14,00 % ≤ 1,0, ако сумарният % палмитинова киселина > 14,00 %
2. Необработено маслиново масло	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, ако сумарният % палмитинова киселина ≤ 14,00 % ≤ 1,0, ако сумарният % палмитинова киселина > 14,00 %
3. Маслиново масло за осветление	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9, ако сумарният % палмитинова киселина ≤ 14,00 % ≤ 1,1, ако сумарният % палмитинова киселина > 14,00 %
4. Рафинирано маслиново масло	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, ако сумарният % палмитинова киселина ≤ 14,00 % ≤ 1,1, ако сумарният % палмитинова киселина > 14,00 %
5. Маслиново масло, съставено от рафинирано масло и необработени маслинови масла	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, ако сумарният % палмитинова киселина ≤ 14,00 % ≤ 1,0, ако сумарният % палмитинова киселина > 14,00 %
6. Нерафинирано маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Рафинирано маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

(1) Съдържание на други мастни киселини (%): палмитинова: 7,50—20,00; палмитолеинова: 0,30—3,50; хептадеканова: ≤ 0,40; хептадеценова ≤ 0,60; стеаринова: 0,50—5,00; олеинова: 55,00—83,00; линолова: 2,50—21,00.

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

Категория	Компонентен състав на стероли						Общо стероли (mg/kg)	Еритродиол и уваол (%) (**)	Восъци (mg/kg) (**)
	Холестерол (%)	Брасикастерол (%)	Кампестерол (1) (%)	Стигмастерол (%)	Привиден β-ситостерол (2) (%)	Делта-7-стигмастенол (1) (%)			
1. Необработено маслиново масло екстра качество	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Необработено маслиново масло	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Маслиново масло за осветление	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (3)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ (3)
4. Рафинирано маслиново масло	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Маслиново масло, съставено от рафинирано масло и необработени маслинови масла	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Нерафинирано маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (4)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ (4)
7. Рафинирано маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Маслиново масло от остатъчен материал	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

(1) Вж. допълнението към настоящото приложение.

(2) Привиден β-ситостерол: делта-5,23-стигмастадиенол+клеростерол+бета-ситостерол+ситостанол+делта-5-авенастерол+делта-5,24-стигмастадиенол.

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

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

Бележки:

а) Резултатите от анализите трябва да бъдат изразени с толкова знака след десетичната запетая, с колкото се дава всяка една характеристика. Последната цифра трябва да бъде увеличена с една единица, ако следващата цифра е по-голяма от 4.

б) Ако дори само една характеристика не отговаря на посочените стойности, категорията на маслото може да бъде променена или то да бъде обявено за несъответстващо за целите на настоящия регламент.

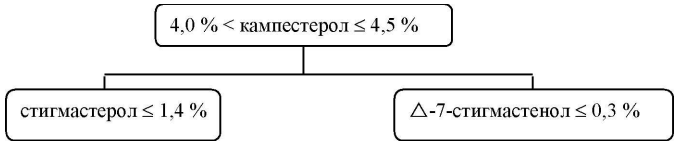
в) За маслиновото масло за осветление и двете качествени характеристики, обозначени със звездичка (*), може да се различават едновременно от установените за тази категория граници.

г) Ако дадена характеристика е обозначена с две звездички (**), това означава, че може двете съответни граници за всички видове нерафинирано маслиново масло от остатъчен материал да бъдат едновременно различни и от двете съответни граници. За маслиновото масло от остатъчен материал и рафинираното маслиново масло от остатъчен материал една от съответните граници може да е различна от посочените стойности.

Допълнение

Диаграми на решенията

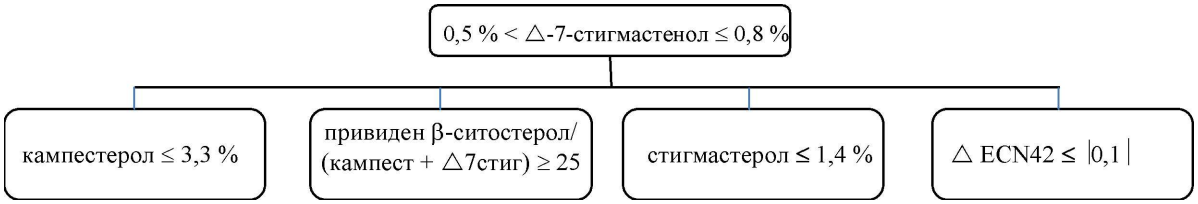
Диаграма на решенията по отношение на **кампестерола** за необработено маслиново масло и необработено маслиново масло екстра качество:



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

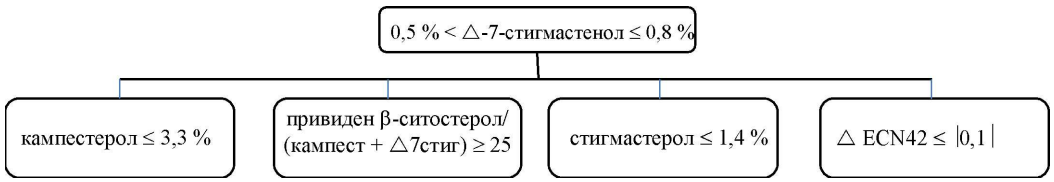
Диаграми на решенията по отношение на делта-7-стигмастенола за:

— Необработено маслиново масло екстра качество и необработено маслиново масло



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

— Маслинови масла от остатъчен материал (нерафинирани и рафинирани)



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

ПРИЛОЖЕНИЕ III

„ПРИЛОЖЕНИЕ Iб

ДИАГРАМА ЗА ПРОВЕРКА НА СЪВМЕСТИМОСТТА НА ПРОБАТА ОТ МАСЛИНОВО МАСЛО С ДЕКЛАРИРАНАТА КАТЕГОРИЯ

Обща таблица

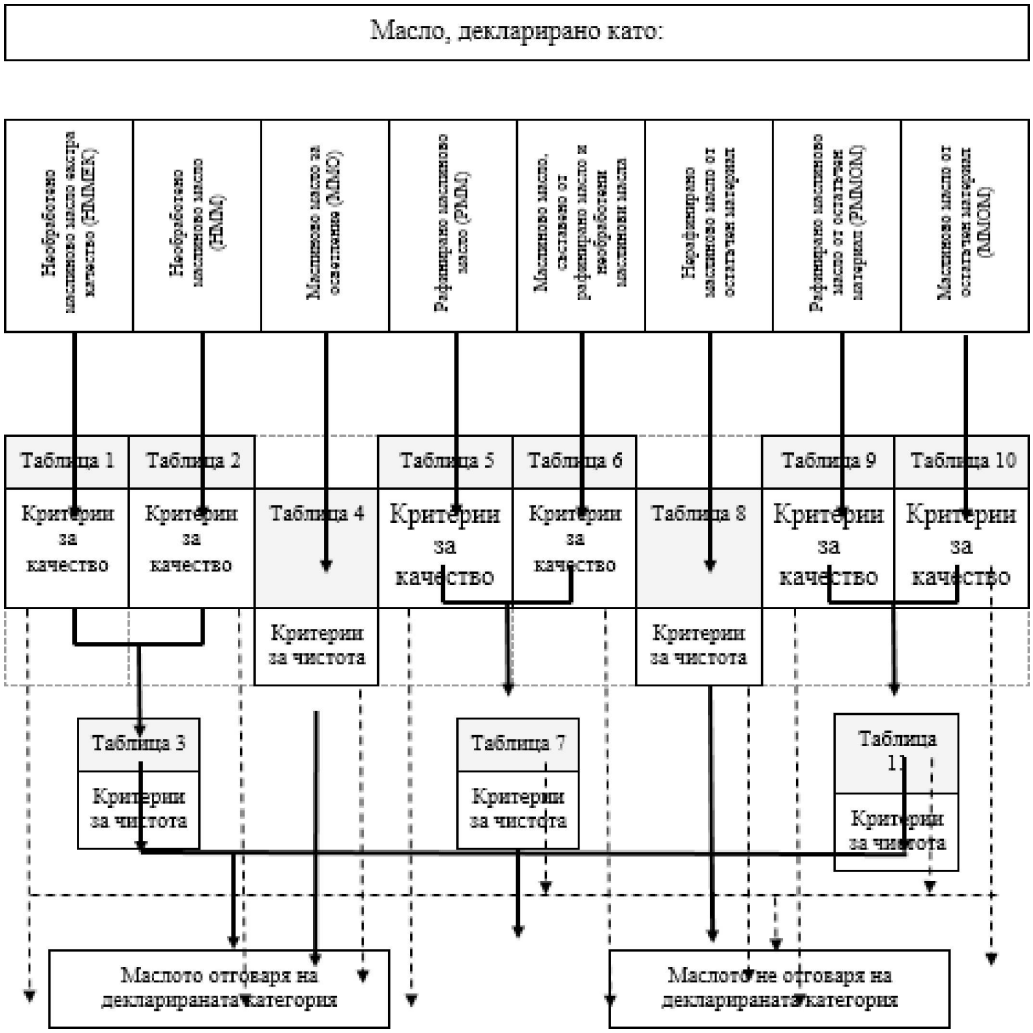


Таблица 1 — Необработено маслиново масло екстра качество — Критерии за качество

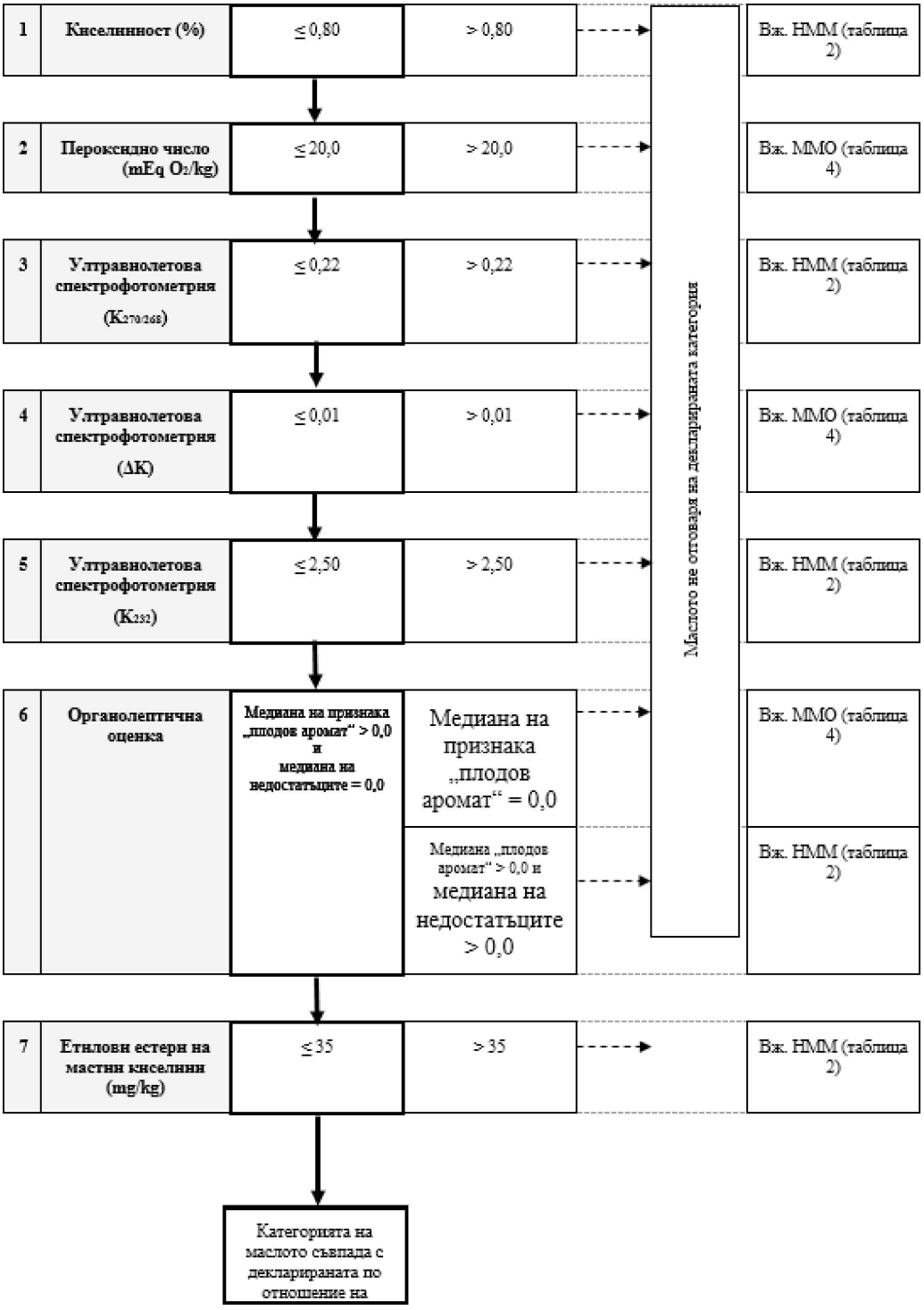


Таблица 2 — Необработено маслиново масло — Критерии за качество

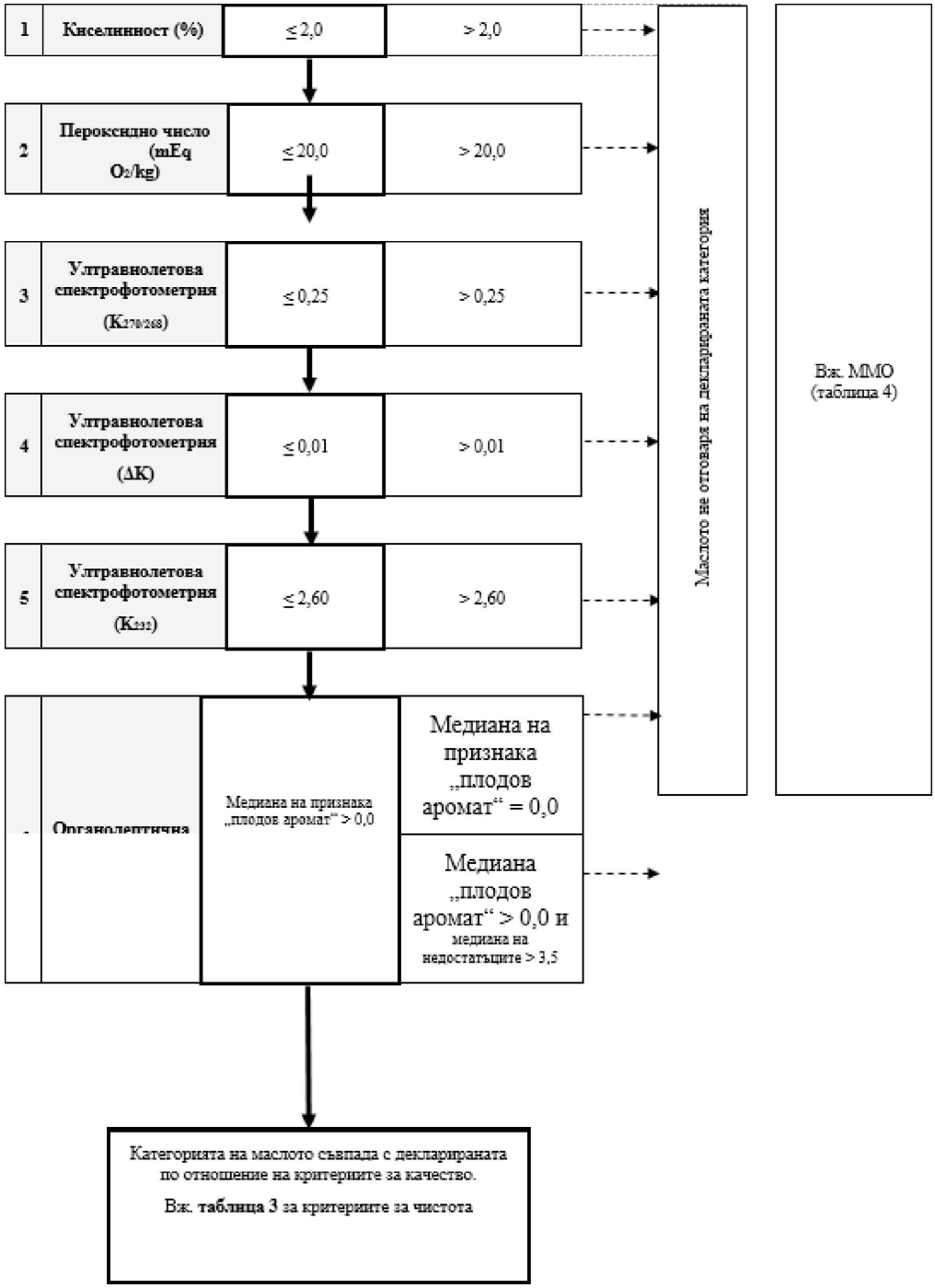


Таблица 3 — Необработено маслиново масло екстра качество и необработено маслиново масло — Критерии за чистота

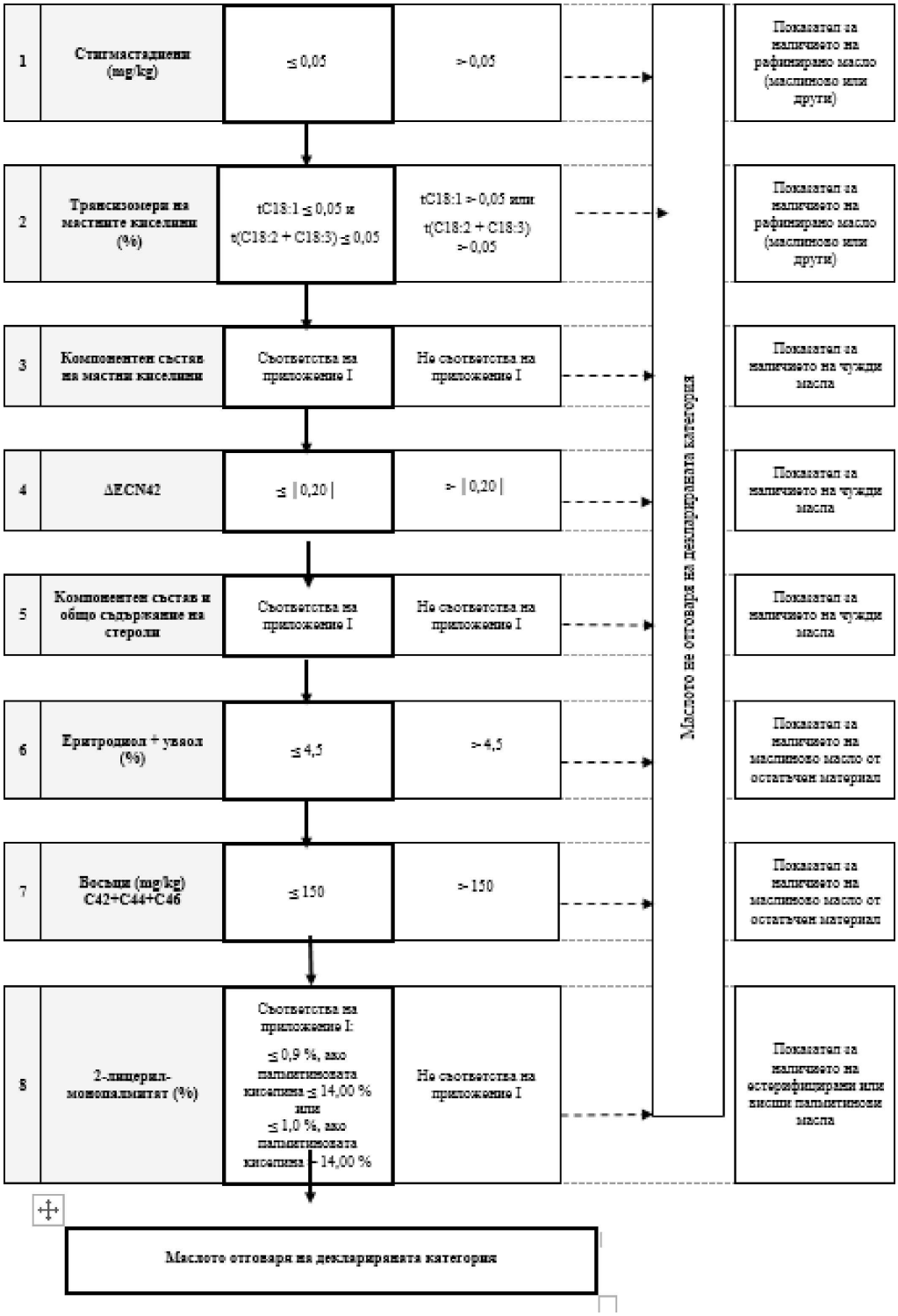


Таблица 4 — Маслиново масло за осветление — Критерии за чистота

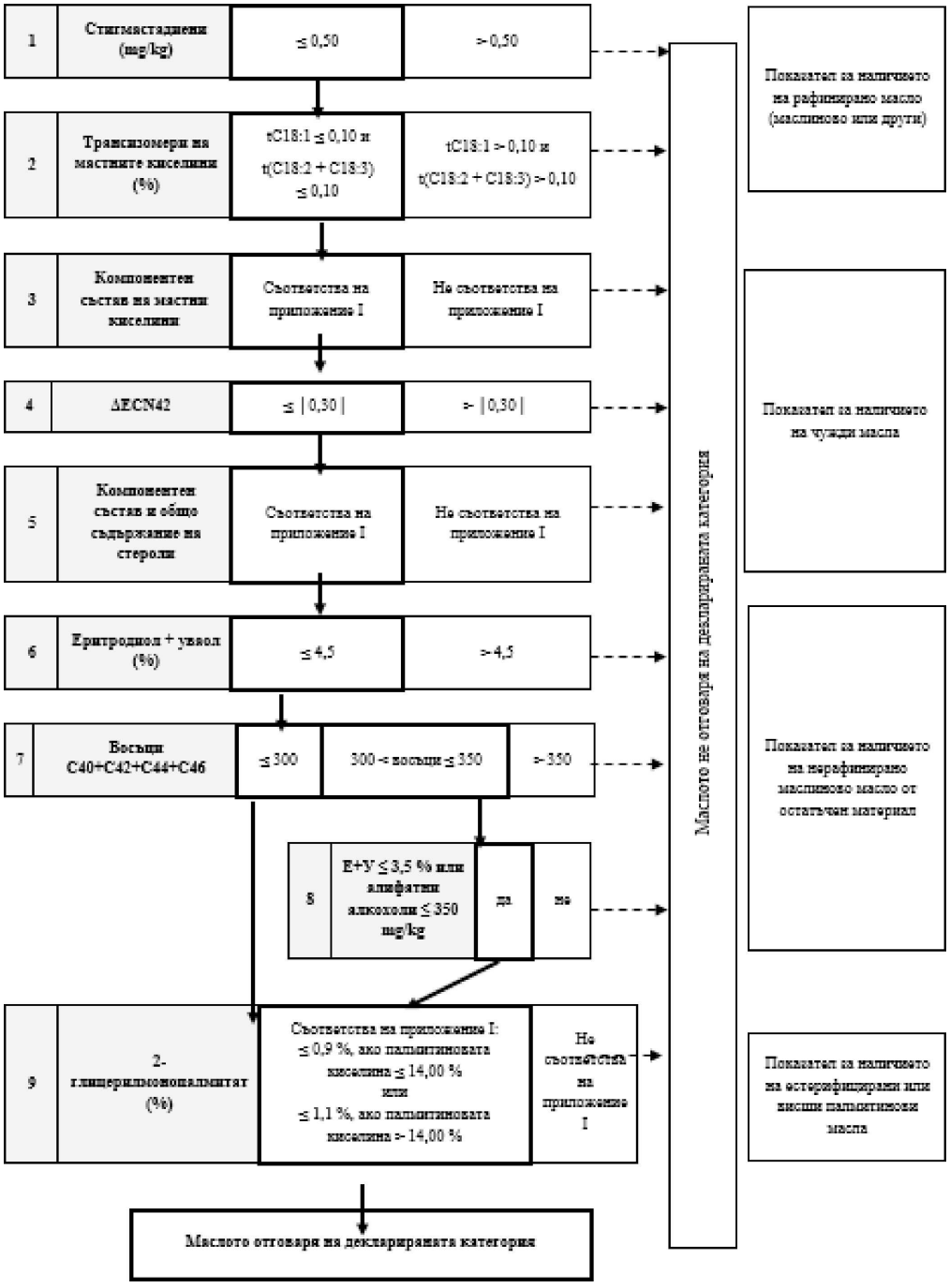


Таблица 5 — Рафинирано маслиново масло — Критерии за качество

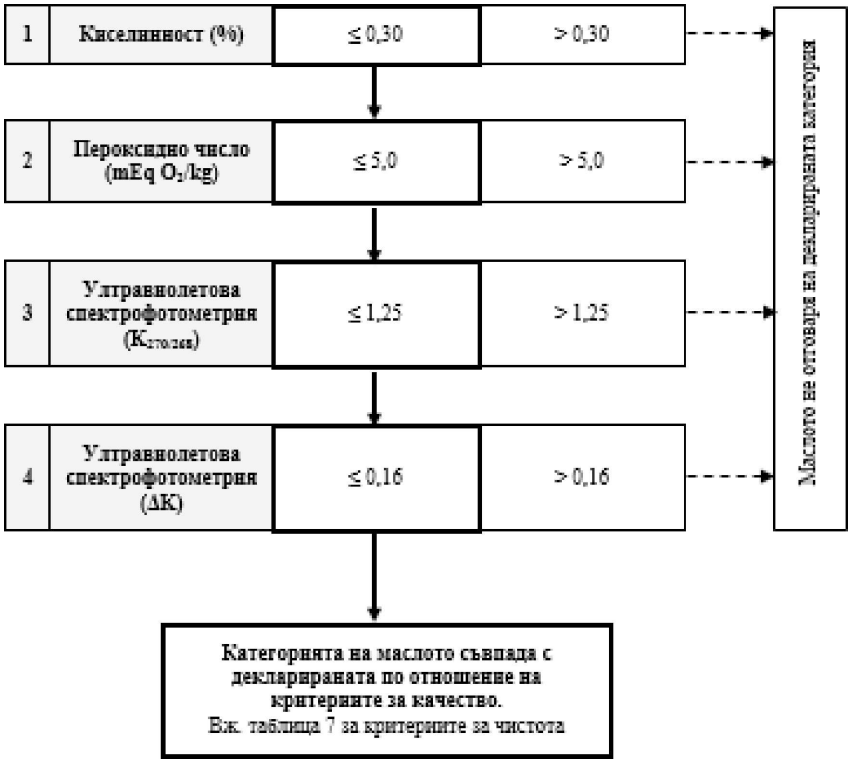


Таблица 6 — Маслиново масло (смес от рафинирано маслиново масло и необработени маслинови масла) — Критерии за качество

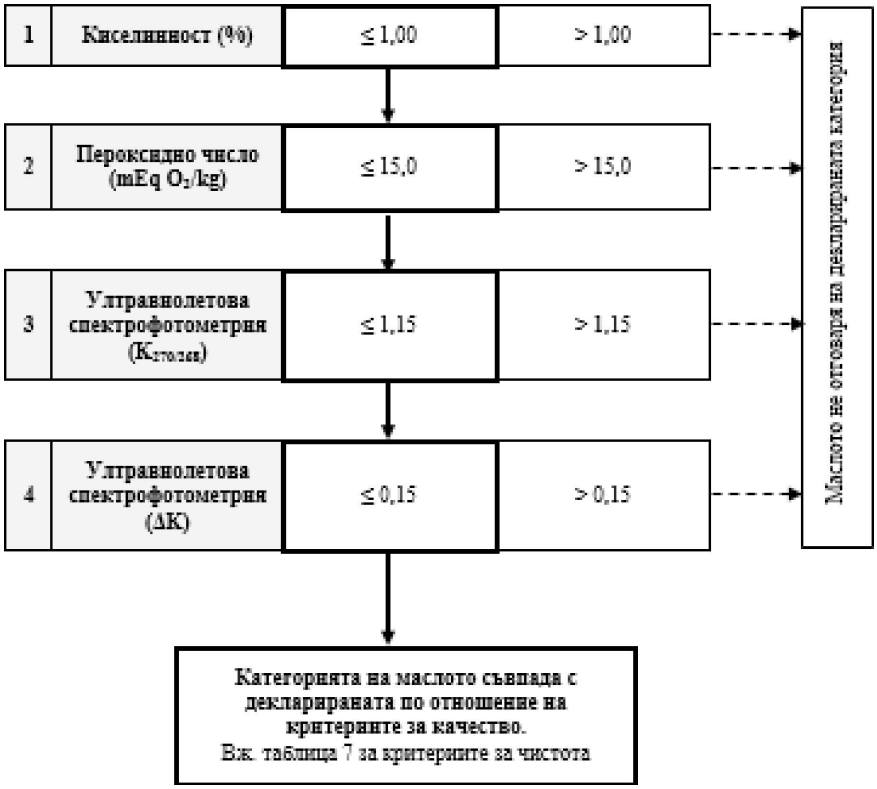


Таблица 7 — Рафинирано маслиново масло и маслиново масло, смес от рафинирано маслиново масло и необработени маслинови масла — Критерии за качество

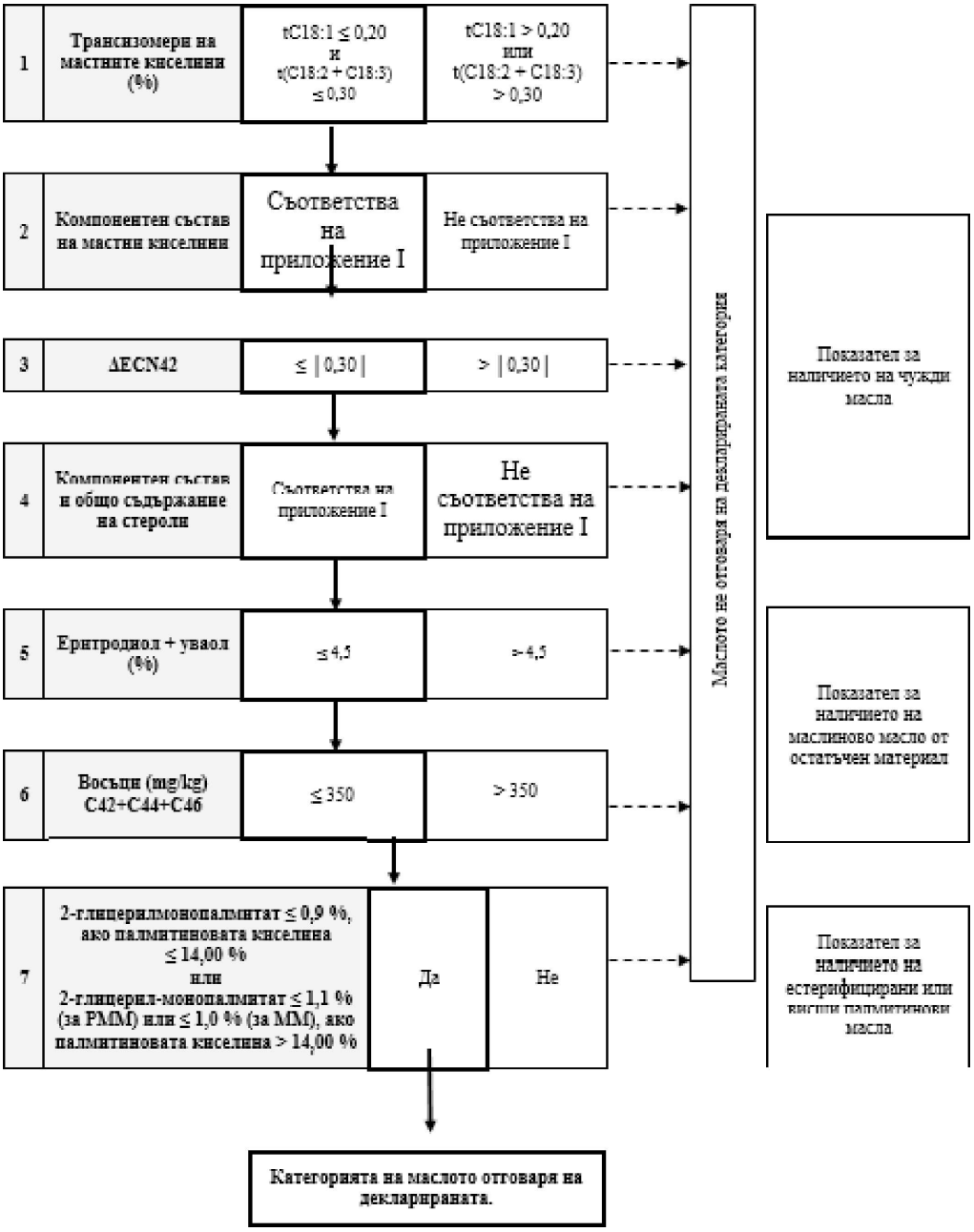


Таблица 8 — Нерафинирано маслиново масло от остатъчен материал — Критерии за чистота

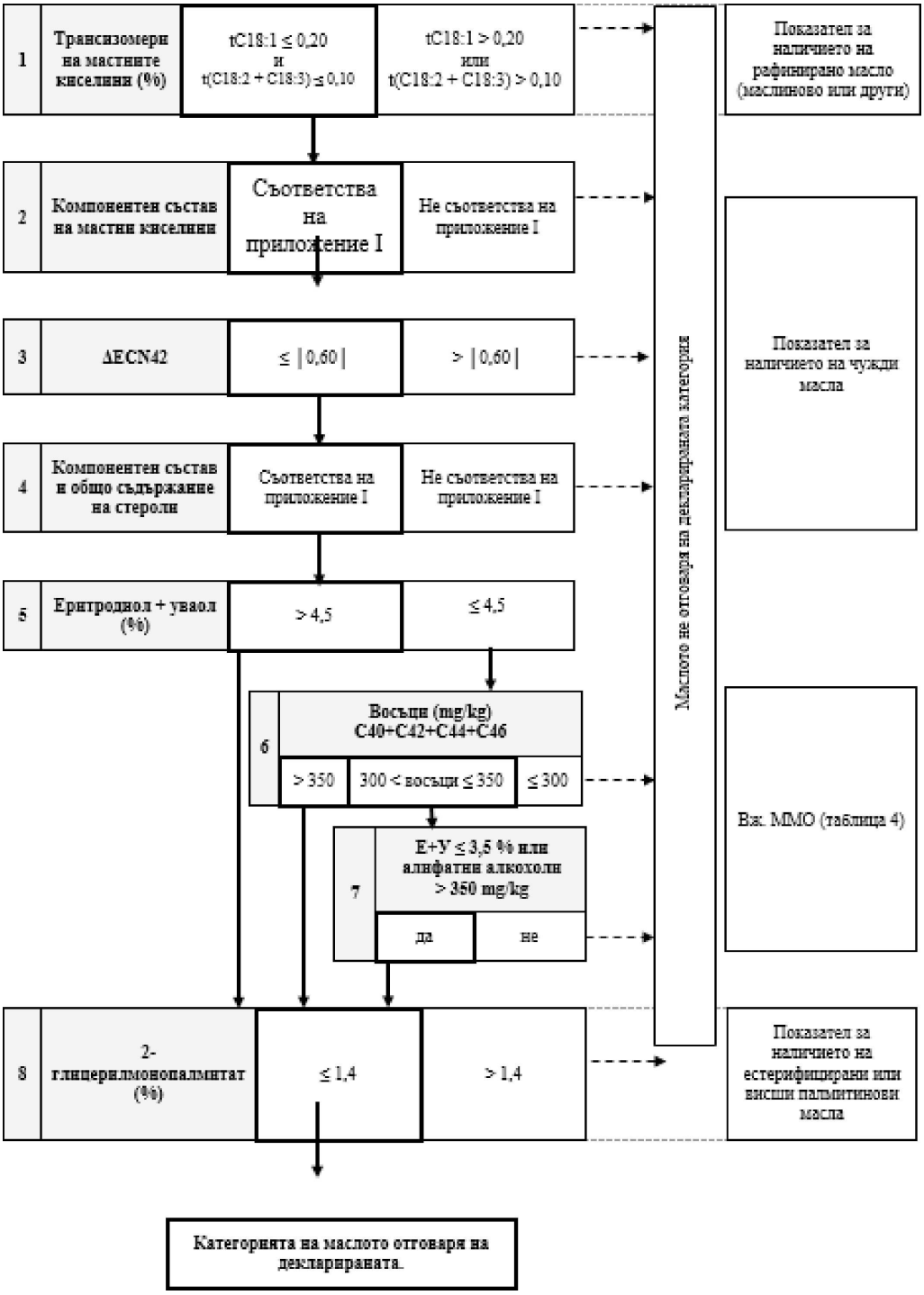


Таблица 9 — Рафинирано маслиново масло от остатъчен материал — Критерии за качество

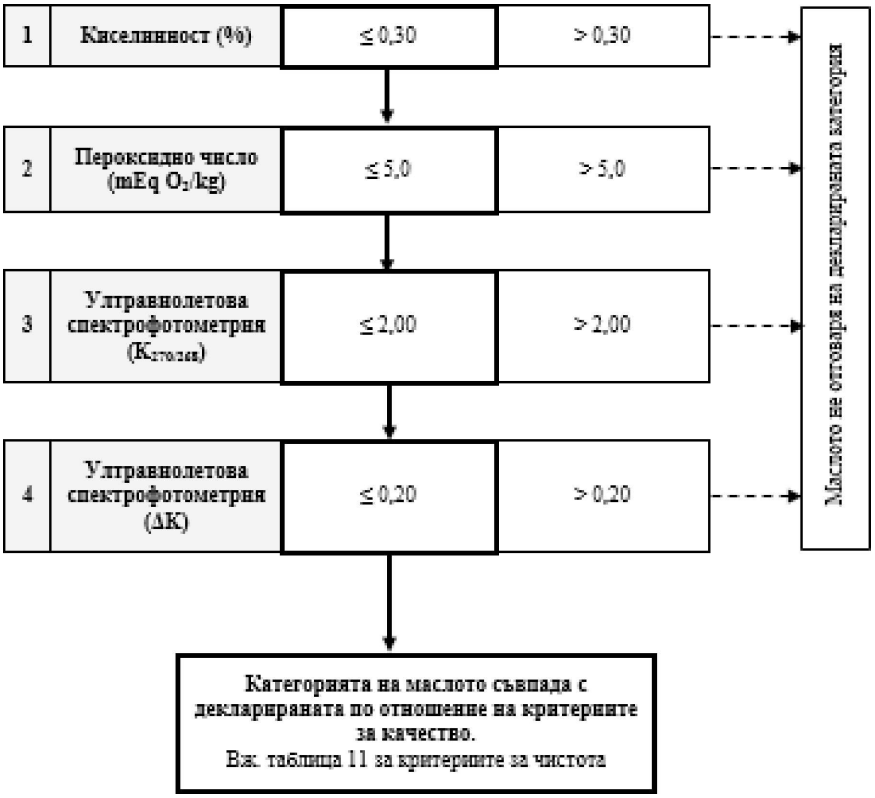


Таблица 10 — Маслиново масло от остатъчен материал — Критерии за качество

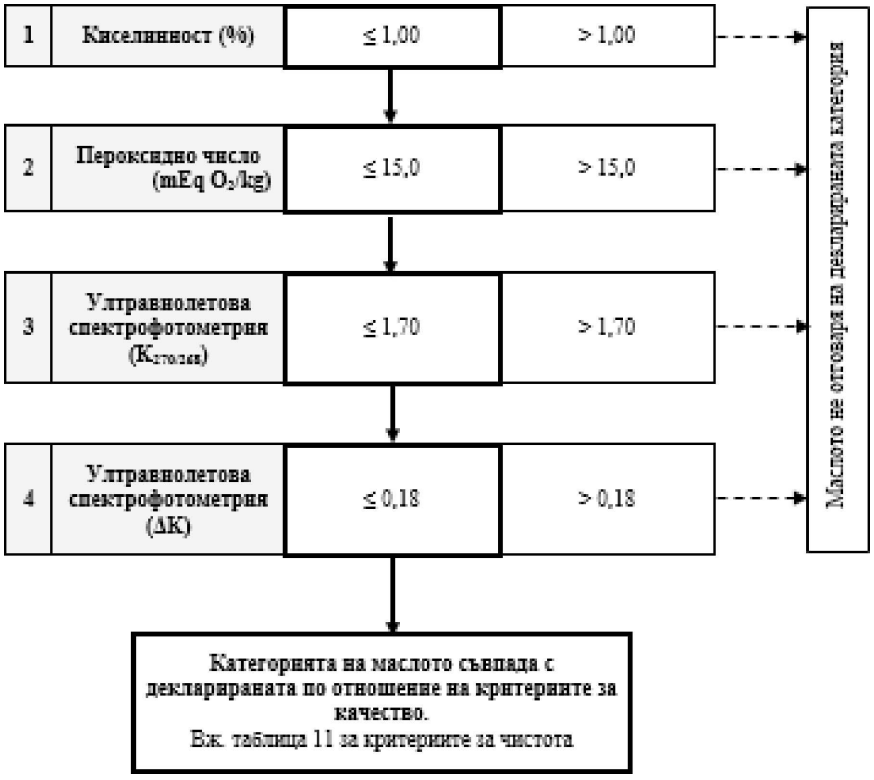
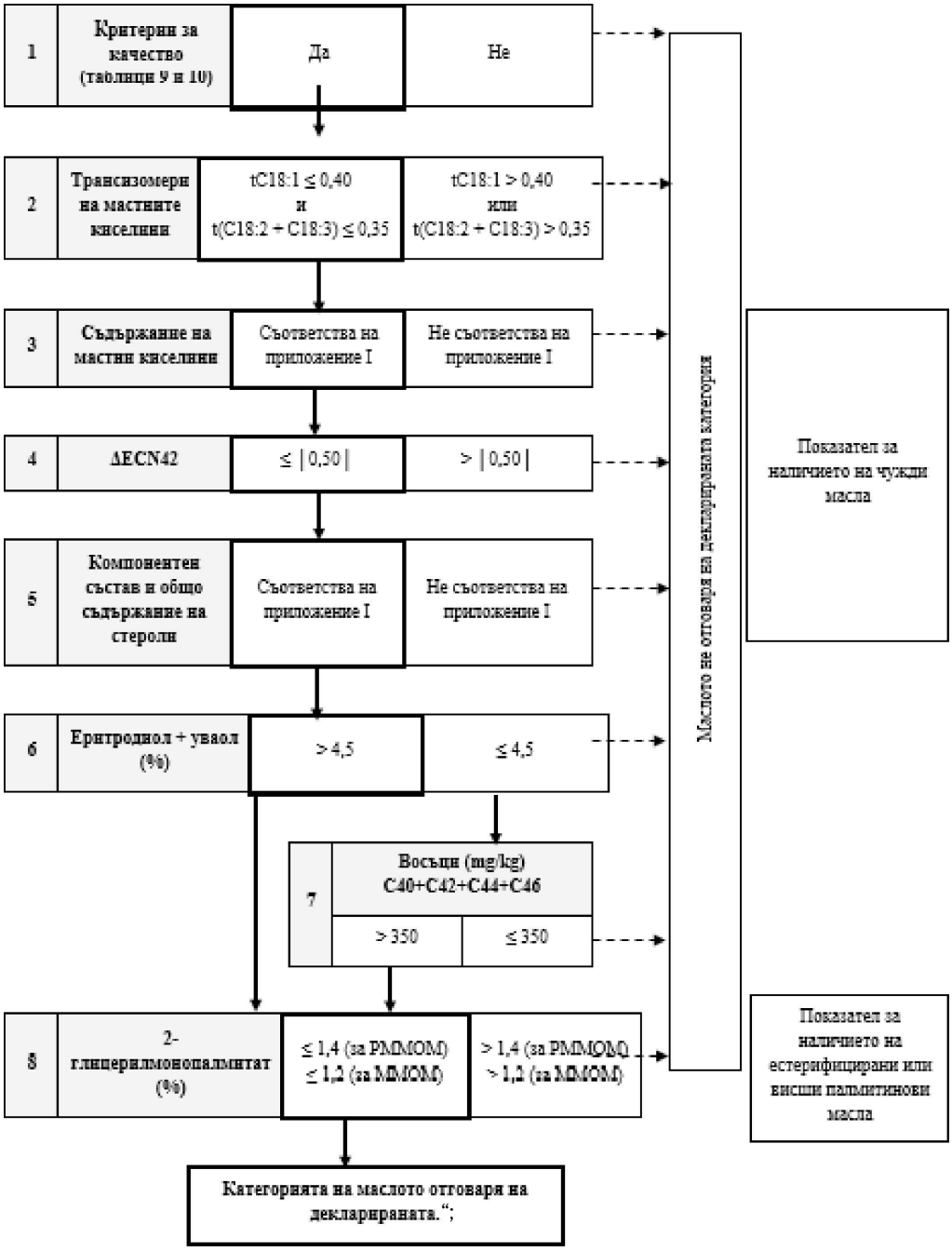


Таблица 11 — Рафинирано маслиново масло от остатъчен материал и маслиново масло от остатъчен материал — Критерии за чистота



ПРИЛОЖЕНИЕ IV

Приложение XII се изменя, както следва:

(1) точка 3.3 се заменя със следното:

„3.3. **Незадължителни понятия за целите на етикетирането**

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

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

— *Силен*, когато медианата на признака е по-висока от 6,0;

— *Среден*, когато медианата на признака е по-висока от 3,0 и по-малка или равна на 6,0;

— *Деликатен*, когато медианата на признака е по-ниска или равна на 3,0;

Плодов аромат	Съвкупност от характерни за маслото обонятелни възприятия, която зависи от сорта маслини, произхожда от здрави и пресни маслини и в която не преобладава вкусът нито на зелените, нито на зрелите маслини. Тя се възприема пряко и/или ретроназално.
Вкус на зелени маслини	Съвкупност от характерни за маслото обонятелни възприятия, която напомня зелени плодове, зависи от сорта маслини и произхожда от здрави и пресни зелени маслини. Тя се възприема пряко и/или ретроназално.
Вкус на зрели маслини	Съвкупност от характерни за маслото обонятелни възприятия, която напомня зрели плодове, зависи от сорта маслини и произхожда от здрави и пресни маслини. Тя се възприема пряко и/или ретроназално.
Добре балансирано	Масло, което не показва липса на баланс, т.е. обонятелно-вкусово и допирно усещане, при което медианата на признака „горчивина“ и тази на признака „стипчивост“ са с не повече от 2,0 пункта по-високи от медианата на признака „плодов аромат“.
Масло с мек вкус	Масло, за което медианата на признаците „горчивина“ и „стипчивост“ е равна на 2,0 или е по-ниска.

Списък на термините в зависимост от интензитета на възприемане:

Термини, за които следва да се представи сертификат за органолептично изпитване	Медиана на признака
Плодов аромат	—
Вкус на зрели маслини	—
Вкус на зелени маслини	—
Деликатен плодов аромат	≤ 3,0
Умерен плодов аромат	3,0 < ср. ≤ 6,0
Силен плодов аромат	> 6,0
Деликатен вкус на зрели маслини	≤ 3,0
Умерен вкус на зрели маслини	3,0 < ср. ≤ 6,0
Силен вкус на зрели маслини	> 6,0
Деликатен вкус на зелени маслини	≤ 3,0
Умерен вкус на зелени маслини	3,0 < ср. ≤ 6,0
Силен вкус на зелени маслини	> 6,0

Термини, за които следва да се представи сертификат за органолептично изпитване	Медиана на признака
Деликатна горчивина	≤ 3,0
Умерена горчивина	3,0 < ср. ≤ 6,0
Силна горчивина	> 6,0
Деликатна стипчивост	≤ 3,0
Умерена стипчивост	3,0 < ср. ≤ 6,0
Силна стипчивост	> 6,0
Добре балансирано масло	Медианата на признака „горчивина“ и медианата на признака „стипчивост“ са с не повече от 2,0 пункта по-високи от медианата на признака „плодов аромат“.
Масло с мек вкус	Медианата на признака „горчивина“ и медианата на признака „стипчивост“ са не повече от 2,0“

(2) Точка 9.4 се заменя със следното:

„9.4. **Класификация на маслото**

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

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

а) Необработено маслиново масло екстра качество: медианата на недостатъците е равна на 0,0, а медианата на признака „плодов аромат“ е по-висока от 0,0;

б) Необработено маслиново масло: медианата на недостатъците е по-висока от 0,0, но не по-висока от 3,5, а медианата на признака „плодов аромат“ е по-висока от 0,0;

в) Необработено маслиново масло за осветление: медианата на недостатъците е по-висока от 3,5, или медианата на недостатъците е по-малка или равна на 3,5, а медианата на признака „плодов аромат“ е равна на 0,0.

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

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

ПРИЛОЖЕНИЕ V

Приложение XVII се изменя, както следва:

(1) Точка 5.1 се заменя със следното:

„5.1. Хексан или смес от алкани с интервал на температурата на кипене 65—70 °C, дестилирани с изправителна колона. Хексанът може да бъде заменен с изооктан (2,2,4-триметилпентан с хроматографска чистота), стига да са постигнати сравними стойности за прецизност. Може да се извърши контрол на остатъчния материал след изпаряване на 100 ml разтворител. Разтворителите с температура на кипене, по-висока от тази на n-хексан, имат нужда от повече време, за се изпарят. Те обаче се предпочитат поради токсичността на хексана.“;

(2) В точка 6.3.3. се добавя следният текст:

„Забележка 10. Когато концентрацията на стигмастадиените е по-висока от 4 mg/kg, ако е необходимо количествено определение, трябва да се използва методът на Международния съвет за маслиновите продукти за определяне на стерени в рафинирано масло.“

ПРИЛОЖЕНИЕ VI

Приложение XVIII се изменя, както следва:

(1) Точка 4.2.1 се заменя със следното:

„4.2.1. Петролен етер, загрят до температура между 40 и 60 °C, за хроматография, или хексан. Хексанът може да бъде заменен с изооктан (2,2,4-триметилпентан с хроматографска чистота), стига да са постигнати сравними стойности за прецизност. Разтворителите с температура на кипене, по-висока от тази на n-хексан, имат нужда от повече време, за се изпарят. Те обаче се предпочитат поради токсичността на хексана.“;

(2) Добавя се следната точка 4.2.12:

„4.2.12. Хептан, хроматографско качество. Хептанът може да бъде заменен с изооктан (2,2,4-триметилпентан с хроматографска чистота).“

ПРИЛОЖЕНИЕ VII

„*ПРИЛОЖЕНИЕ XIX*

ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СТЕРОЛНИЯ СЪСТАВ И СЪДЪРЖАНИЕ И НА АЛКОХОЛНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ЧРЕЗ КАПИЛЯРНА ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ

1. ОБХВАТ

Методът описва процедура за определяне на съдържанието на отделните и общите алкохолни съединения на маслиновите масла и маслиновите масла от остатъчен материал, както и на смесите от тези два вида масло.

Алкохолните съединения в маслиновите масла и маслиновите масла от остатъчен материала включват алифатните алкохоли, стеролите и тритерпеновите диалкохоли.

2. ПРИНЦИП

Маслото, към което е добавен α-холестанол и 1-ейкозанол като вътрешен стандарт, се осапунява с етанолов разтвор на калиев хидроксид, след което неосапуняемите съставки се екстрахират с помощта на етилов етер.

Различните фракции на алкохолните съединения се отделят от неосапуняемите съставки или чрез тънкослойна хроматография на основна плака със силикагел (референтен метод), или чрез BETX със колона от силикагел. Фракцията, възстановена от разделянето със силикагел, се преобразува в триметилсилилови етери, след което се анализира чрез капилярна газова хроматография.

ЧАСТ 1

ПРИГОТВЯНЕ НА НЕОСАПУНЯЕМИТЕ СЪСТАВКИ

1. ОБХВАТ

В тази част се описват подготовката и извличането на неосапуняемите съставки. Това включва подготовката и извличането на неосапуняемите съставки от маслиновите масла и маслиновите масла от остатъчен материал.

2. ПРИНЦИП

Част за изпитване се осапунява чрез кипене с обратен хладник с етанолов разтвор на калиев хидроксид. Неосапуняемите съставки се екстрахират с помощта на диетилов етер.

3. ОБОРУДВАНЕ

Стандартно лабораторно оборудване, включващо по-конкретно следното:

3.1. Колба с кръгло дъно с вместимост 250 ml с обратен хладник със стъклен шлиф.

3.2. Делителна фуния с вместимост 500 ml.

3.3. Колби с вместимост 250 ml.

3.4. Микроспринцовки с вместимост 100 µl и 500 µl.

3.5. Цилиндрична фуния за филтруване, подходяща за филтруване под вакуум, с порьозна преграда G3 (порьозност 15 —40 µm), диаметър приблизително 2 cm, височина 5 cm и мъжка муфа с шлиф.

3.6. Конусовидна колба с вместимост 50 ml и женска муфа с шлиф, която може да се монтира към фунията за филтруване (3.5).

3.7. Епруветка с вместимост 10 ml с конично дъно и стъклена тапа.

3.8. Десикатор за калциев дихлорид.

4. РЕАГЕНТИ

4.1. Калиев хидроксид с минимален титър 85 %.

4.2. Етанолов разтвор на калиев хидроксид — приблизително 2 M.

130 g калиев хидроксид (4.1) се разтваря с охлаждане в 200 ml дестилирана вода и се долива до един литър с етанол (4.7). Разтворът се съхранява в плътно затворени бутилки от тъмно стъкло за не повече от два дни.

4.3. Етилов етер с чистота за анализ.

4.4. Безводен натриев сулфат с чистота за анализ.

4.5. Ацетон с чистота за хроматографски анализ.

4.6. Етилов етер с чистота за хроматографски анализ.

4.7. Етанол с чистота за анализ.

4.8. Етилацетат с чистота за анализ.

4.9. Вътрешен стандарт, α-холестанол с чистота над 99 % (чистотата трябва да бъде проверена чрез газова хроматография).

4.10. Вътрешен стандартен разтвор на α-холестанол 0,2 разтвор (m/V) в етилацетат (4.8).

4.11. Разтвор на фенолфталеин, 10 g/l в етанол (точка 4.7).

4.12. 0,1 % (m/v) разтвор на 1-ейкозанол в етилацетат (вътрешен стандарт).

5. ПРОЦЕДУРА

С микроспринцовка с вместимост от 500 µl (3.4) се въвежда в колба от 250 ml (3.1) обем от вътрешния стандартен разтвор на α-холестанол (4.10) и обем от 1-ейкозанол (4.12) със съдържание на количество холестанол и ейкозанол, съответстващо на около 10 % от стеролното и алкохолно съдържание на пробата. Така например за проба маслиново масло с маса 5 g се прибавят 500 µl разтвор на α-холестанол (4.10) и 250 µl разтвор на 1-ейкозанол (4.12). За проба маслиново масло от остатъчен материал се прибавят 1 500 µl разтвор както на α-холестанол (4.10), така и на 1-ейкозанол (4.12). Пробата се подлага на изпарение до изсъхване на топла водна баня със слаба струя азот. След охлаждане на колбата в нея се претеглят 5,00 ± 0,01 g от сухата филтрувана проба.

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

Добавят се 50 ml 2M етанолов разтвор на калиев хидроксид (4.2) и малко пемза, поставя се обратният хладник и се нагрява до слабо кипене, докато се извърши осапуняването (разтворът се избистря). Нагряването се продължава още 20 минути, след което се прибавят 50 ml дестилирана вода през върха на хладника, хладникът се отстранява, а колбата се охлажда до приблизително 30 °C.

Съдържанието на колбата се прехвърля количествено в делителна фуния с вместимост 500 ml (3.2), като се използват няколко части дестилирана вода (50 ml). Добавят се приблизително 80 ml етилов етер (4.6) и делителната фуния се разклаща енергично в продължение на около 60 секунди, като налягането се освобождава периодично чрез нейното обръщане и отваряне на спирателния кран. Изчаква се до получаването на пълно разделяне на две фази (бележка 2). След това сапуненият разтвор се отлива възможно най-изчерпателно в отделна делителна фуния. По същия начин се извършват още две екстракции на фазата на водно-алкохолна смес, като всеки път се използват 60 до 70 ml етилов етер (4.6).

Забележка 2: Всяка емулсия може да бъде разрушена с прибавяне на малки количества етанол (4.7).

Трите етерни екстракта се смесват в делителна фуния, съдържаща 50 ml вода. Промиването с вода (50 ml) продължава, докато промивната вода престане да се оцветява в розово при добавянето на капка разтвор на фенолфталеин (4.11). След отстраняване на промивната вода се филтрува безводен натриев сулфат (4.4) в предварително претеглена колба с вместимост 250 ml, като фунията и филтърът се промиват с малки количества етилов етер (4.6).

Разтворителят се изпарява под вакуум чрез дестилация в ротационен изпарител при температура 30 °C. Добавят се 5 ml ацетон (4.5) и летливият разтворител се отстранява напълно посредством слаба струя азот. Остатъкът се изсушава в пещ при температура 103 ± 2 °C в продължение на 15 минути. След това се охлажда в десикатори и се претегля с точност до 0,1 mg.

ЧАСТ 2

ОТДЕЛЯНЕ НА ФРАКЦИИТЕ НА АЛКОХОЛНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ

1. ОБХВАТ

Неосапуняемите съставки, подготвени в част 1, се разделят на фракции, представляващи отделните алкохолни съединения, алифатните алкохоли, стеролите и тритерпеновите диалкохоли (еритродиол и уваол).

2. ПРИНЦИП

Неосапуняемите съставки могат да бъдат разделени на фракции с помощта на основна тънкослойна хроматография (референтен метод), откроени, а съответните ивици издраскани и екстрахирани. Алтернативен метод на отделяне е ВЕТХ с колона от силикагел и ултравиолетов детектор, като се събират отделните фракции. Алифатните и тритерпеновите алкохоли, както и стеролните и тритерпеновите диалкохоли се изолират заедно.

3. ОБОРУДВАНЕ

Стандартно лабораторно оборудване, включващо по-конкретно следното:

3.1. Пълен набор за анализ чрез тънкослойна хроматография с използване на стъклени плаки с размер 20 × 20 cm.

3.2. Ултравиолетова лампа с дължина на вълната 366 или 254 nm.

3.3. Микроспринцовки с вместимост 100 µl и 500 µl.

3.4. Цилиндрична фуния за филтруване, подходяща за филтруване под вакуум, с порьозна преграда G3 (порьозност 15 —40 µm), диаметър приблизително 2 cm, височина 5 cm и мъжка муфа с шлиф.

3.5. Конусовидна колба с вместимост 50 ml и женска муфа с шлиф, която може да се монтира към фунията за филтруване (3.4).

3.6. Епруветка с вместимост 10 ml с конично дъно и стъклена тапа.

3.7. Десикатор с калциев дихлорид.

3.8. ВЕТХ система, състояща се от:

3.8.1. Бинарна помпа.

3.8.2. Ръчен или автоматичен инжектор, оборудван с дозираща капиляра от 200 µl.

3.8.3. Редови дегазатор.

3.8.4. Детектор за UV-VIS или IR.

3.9. ВЕТХ колона (25 cm × 4 mm в диам.) със силикагел 60 (размер на частицата 5 µm).

3.10. Филтър за спринцовки, 0,45 µm.

3.11. Конусовидна колба 25 ml.

4. РЕАГЕНТИ

4.1. Калиев хидроксид с минимален титър 85 %.

4.2. Етанолов разтвор на калиев хидроксид — приблизително 2 М.

130 g калиев хидроксид (4.1) се разтваря с охлаждане в 200 ml дестилирана вода и се долива до един литър с етанол (4.9). Разтворът се съхранява в плътно затворени бутилки от тъмно стъкло за не повече от два дни.

4.3. Етилов етер с чистота за анализ.

4.4. Етанолов разтвор на калиев хидроксид — приблизително 0,2 М.

13 g калиев хидроксид (4.1) се разтваря в 20 ml дестилирана вода и се долива до един литър с етанол (4.9).

4.5. Стъклени плаки с размер 20 x 20, покрити със силикагел, без флуоресцентен индикатор и с дебелина 0,25 mm (могат да се доставят от търговската мрежа готови за употреба).

4.6. Ацетон с чистота за хроматографски анализ.

4.7. n-хексан с чистота за хроматографски анализ.

4.8. Етилов етер с чистота за хроматографски анализ.

4.9. Етанол с чистота за анализ.

4.10. Етилацетат с чистота за анализ.

4.11. Референтен разтвор за тънкослойна хроматография: холестерол, фитостероли, алкохоли плюс 5 % разтвор на еритродиол в етилацетат (точка 4.10).

4.12. 0,2 % разтвор на 2,7-дихлорофлуоресцеин в етанолов разтвор. Той се алкализира слабо чрез добавяне на няколко капки 2 M алкохолен разтвор на калиев хидроксид (4.2).

4.13. Смес от n-хексан (4.7)/етилов етер (4.8) в съотношение 65:35 (V/V).

4.14. Мобилна фаза за ВЕТХ от n-хексан (4.7)/етилов етер (4.8) в съотношение 1:1 (V/V).

5. РЕФЕРЕНТЕН МЕТОД: ОТДЕЛЯНЕ НА АЛКОХОЛНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ ЧРЕЗ ТЪНКОСЛОЙНА ХРОМАТОГРАФИЯ (ТХ) НА ОСНОВНА ПЛАКА

Подготовка на основните плаки за тънкослойна хроматография. Плаки със силикагел (4.5) се потапят напълно в 0,2 M етанолов разтвор на калиев хидроксид (4.4) 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 (3.7) с калциев хлорид до момента на употреба (така обработените плаки трябва да се използват в рамките на 15 дни).

Поставя се смес от хексан/етилов етер (4.13) (забележка 3) в проявителна камера на дълбочина около 1 cm. Камерата се затваря с подходящия капак и се оставя така за поне един час на хладно място, така че да се установи течно-парното равновесие. 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 осигурява по-равномерно и правилно елуиране на съставките.

Забележка 3: Проявителният разтвор трябва да се подменя преди всеки анализ, с оглед на получаването на идеално възпроизводими условия за проявяване. Може да се използва също алтернативен разтворител 50:50 (V/V) n-хексан/етилов етер.

Приготвя се приблизително 5 % разтвор на неосапуняемите съставки от част 1 в етилацетат (4.10) и с помощта на микроспринцовка с вместимост 100 µl (3.3) 0,3 ml от разтвора се нанасят на тънка и равномерна ивица върху долния край (2 cm) на хроматографската плака (4.5). На същото равнище като ивицата се накапват 2 до 3 µl от референтния разтвор (4.11), така че ивицата на стеролите, тритерпеновите диалкохоли и алкохолите да може да бъде разпозната след проявяването.

Плаката се поставя в проявителната камера (3.1). Околната температура се поддържа между 15 и 20 °C (забележка 4). Камерата се затваря веднага с капака и се оставя за елуиране, докато фронтът на разтворителя достигне приблизително 1 cm от горния ръб на плаката. След това плаката се изважда от проявителната камера и разтворителят се изпарява под струя горещ въздух или като плаката се остави за кратко време под камина.

Забележка 4: По-високата температура може да влоши разделянето.

Плаката се напръсква леко и равномерно с разтвор на 2,7-дихлорофлуоресцеин (4.12), след което се оставя да изсъхне. Когато плаката се наблюдава под ултравиолетова светлина, ивиците на стеролите, тритерпеновите диалкохоли и алкохолите могат да се разпознаят, като се изравнят с петната, получени от референтния разтвор (4.11). Границите на ивиците се очертават с черен молив по краищата на флуоресценцията (вж. фигура 1 относно плаките за тънкослойна хроматография).

Силикагелът в очертаните участъци се изтърква с помощта на метална шпатула. Отделеният стрит на фин прах материал от силикагел се поставя във фунията за филтруване (3.4). Прибавят се 10 ml горещ етилов ацетат (точка 4.10), разбърква се добре с металната шпатула и се филтрува (ако е необходимо, под вакуум), като филтратът се събира в конусовидната колба (3.5), свързана с фунията за филтруване.

Утайката от фунията се промива три пъти с етилов етер (4.3) (приблизително 10 ml всеки път) и филтратът се събира в същата колба, свързана с фунията; филтратът се изпарява до обем 4—5 ml и остатъчният разтвор се прехвърля в епруветка с вместимост 10 ml (3.6), която е била претеглена предварително; изпарява се до изсъхване чрез слабо подгряване под слаба струя азот; утайката се разтваря отново с няколко капки ацетон (4.6), след което отново се изпарява до изсъхване. Остатъкът в епруветката се състои от фракцията на стеролите и тритерпеновите диалкохоли или алкохолите и тритерпеновите алкохоли.

6. ОТДЕЛЯНЕ НА АЛКОХОЛНАТА ФРАНЦИЯ ЧРЕЗ ВЕТХ

Неосапуняемите съставки, получени в част 1, се разтварят в 3 ml от мобилната фаза (4.14), разтворът се филтрува със спринцовка за филтруване (3.10) и се запазва.

Инжектират се 200 µl от филтрувания неосапуняем разтвор във ВЕТХ (3.8).

Извършва се отделяне с ВЕТХ при 0,8 ml/min, изваждат се първите 5 min и филтратът се събира в конусовидна колба от 25 ml (3.11) между 5 и 10 min за алифатните и тритерпеновите алкохоли и между 11 и 25 min за стеролите и еритродиола и уваола (забележка 5).

Отделянето може да бъде наблюдавано с ултравиолетов детектор с дължина на вълната от 210 nm или рефрактометричен детектор (вж. фигура 6).

Фракциите се изпаряват до сухо и се приготвят за хроматографски анализ.

Забележка 5: Наляганието на помпата на ВЕТХ следва да се контролира внимателно; етиловият етер може да увеличи наляганието; дебитът трябва да се коригира, за да се запази наляганието под контрол.

ЧАСТ 3

АНАЛИЗ ЧРЕЗ ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ НА ФРАКЦИИТЕ НА АЛКОХОЛНИТЕ СЪЕДИНЕНИЯ

1. ОБХВАТ

В тази част са дадени общи насоки за прилагане на капилярната газова хроматография с цел определяне на качествения и количествения състав на алкохолните съединения, изолирани съгласно способа, посочен в част 2 от настоящия метод.

2. ПРИНЦИП

Фракциите, събрани от неосапуняемите съставки с помощта на тънкослойна хроматография или ВЕТХ, се преобразуват в триметилсилилови етери, след което се анализират чрез капилярна газова хроматография с инжектиране с разделяне и пламъчнойонизационен детектор.

3. ОБОРУДВАНЕ

Стандартно лабораторно оборудване, включващо по-конкретно следното:

3.1. Епруветка с вместимост 10 ml с конично дъно и стъклена тапа.

3.2. Газов хроматограф, подходящ за използване с капилярна колона, снабдена с инжекционна система за разделяне, който се състои от:

3.2.1. Термостатична камера за колони с възможност за поддържане на желаната температура с точност до ± 1 °C;

3.2.2. Инжектор с възможност за настройка на температурата с изпарителен елемент от персиланизирано стъкло и със система за разделяне;

3.2.3. Пламъчнойонизационен детектор (ПЙД);

3.2.4. Система за събиране на данни, подходяща за употреба с ПЙД (3.10.3.), с възможност за ръчно въвеждане.

3.3. Капилярна колона от стопен кварц с дължина 20—30 m и вътрешен диаметър 0,25—0,32 mm, покрита с 5 % дифенил — 95 % диметилполисилоксан (неподвижна фаза с SE-52 или SE-54 или еквивалентна) до постигането на еднородна дебелина между 0,10 и 0,30 µm.

3.4. Микроспринцовка за газова хроматография с вместимост 10 µl и циментирана игла, подходяща за инжектиране с разделяне.

4. РЕАГЕНТИ

4.1. Безводен пиридин, с чистота за хроматографски анализ.

4.2. Хексаметилдисилазан с чистота за анализ.

4.3. Триметилхлоросилан с чистота за анализ.

4.4. Разтвори на проби от триметилсилилови етери. Те се приготвят в момента на употреба от стероли и еритродиол, получени от масла, в които се съдържат.

4.5. Стандартни разтвори на триметилсилилови етери на алифатни алкохоли от C20 до C28. Те могат да се приготвят от смеси от чисти алкохоли тогава, когато са необходими за употреба.

4.6. Газ носител: водород или хелий, с чистота за газова хроматография.

4.7. Спомагателни газове: водород, хелий, азот и въздух, пречистени за газова хроматография.

4.8. Реагент за силилиране, състоящ се от смес от пиридин/ хексаметилдисилазан/триметилхлоросилан в съотношение 9:3:1 (V/V/V).

4.9. n-хексан с чистота за хроматографски анализ.

5. ПРИГОТВЯНЕ НА ТРИМЕТИЛСИЛИЛОВИТЕ ЕТЕРИ

В епруветката (3.1), съдържаща фракцията на алкохолите, се добавя реагентът за силилиране (4.8) (забележка 6) в съотношение 50 μl за всеки милиграм алкохолни съединения, като се избягва проникването на влага (бележка 7).

Забележка 6: Готови за употреба разтвори могат да се доставят от търговската мрежа. Могат да се доставят и други реагенти за силилиране, като например бистриметилсилилтрифлуороацетамид + 1 % триметилхлоросилан, който трябва да се разреди със същия обем безводен пиридин. Пиридинът може да се замени със същото количество ацетонитрил.

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

Епруветката се затваря (3.1) и внимателно се разклаща (без да се преобръща) до пълно разтваряне на съставките. Оставя се за да престои най-малко 15 минути при стайна температура, след което се центрофугира в продължение на няколко минути. Бистрият разтвор е готов за анализ чрез газова хроматография.

6. АНАЛИЗ ЧРЕЗ ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ

6.1. Предварителни операции, кондициониране на капилярната колона

Колоната (3.3) се монтира в газовия хроматограф чрез свързване на входния край с инжектора с разделяне и на изходния край — с детектора.

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

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

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

6.2. Условия на експлоатация

Температурната програма и дебитът на газа носител се оптимизират, така че да се получат хроматограми, подобни на фигури 3—6.

Следните параметри са тествани и установени за полезни:

6.2.1. Алифатни алкохоли

Пещна програма	180 °C (8 min) → 260 °C (при 5 °C/min) → 260 °C (15 min)
Температура на инжектора	280 °C
Температура на детектора	290 °C
Линейна скорост на газа носител	Хелий (20 до 30 cm/s); Водород (30 до 50 cm/s)
Съотношение на разделяне	1:50 до 1:100
Инжектиран обем	0,5 до 1 µl от разтвора на триметилсилилови етери

6.2.2. Стероли и тритерпенови диалкохоли

Пещна програма	260 ± 5 °C изотермално
Температура на инжектора	280—300 °C
Температура на детектора	280—300 °C
Линейна скорост на газа носител	Хелий (20 до 30 cm/s); Водород (30 до 50 cm/s)
Съотношение на разделяне	1:50 до 1:100
Инжектиран обем	0,5 до 1 µl от разтвора на триметилсилилови етери

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

— Времето за задържане на алкохол C26 да е 18 ± 5 минути.

— Пикът на алкохол C22 да е 80 ± 20 % от стойността на пълната скала за маслиново масло и 40 ± 20 % от стойността на пълната скала за масло от остатъчни продукти.

— Времето на задържане на β-ситостерола трябва да е 20 ± 5 минути.

— Пикът на кампестерола трябва да е, както следва: за маслиновото масло (общо съдържание 3 %) — 20 ± 5 % от пълната стойност.

— Всички налични стероли трябва да са разделени. В добавка на това, че трябва да са разделени, пиковете 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. Допуска се обаче непълно отделяне, при условие че пикът при RRT 1,02 (ситостанол) може да се изрази количествено чрез използването на перпендикуляр.

6.3. Провеждане на анализа

С помощта на микроспринцовката с вместимост 10 µl (3.4) се изтегля 1 µl хексан, въвежда се 0,5 µl въздух и впоследствие — 0,5 до 1 µl от разтвора на пробата. Буталото на спринцовката се изтегля, за да се изпразни иглата. Иглата се въвежда през мембраната на инжектора и след една до две секунди разтворът се инжектира бързо, като иглата се изважда бавно след приблизително пет секунди. Също така може да се използва автоматичен инжектор.

Записването продължава до пълното елуиране на триметилсилиловите етери на наличните алкохолни съединения. Базовата линия трябва да продължава да е в изпълнение на изискванията на съответните условия на експлоатация (6.2.1 или 6.2.2).

6.4. Идентифициране на пиковете

Идентифицирането на отделните пикове се извършва въз основа на времената на задържане и чрез сравнение със сместа от алифатни и тритерпенови алкохоли или стероли и триметилсилилови етери на тритерпеновите диалкохоли, анализирани при същите условия. Хроматограма на фракциите на алифатните и тритерпеновите алкохоли е показана на фигура 3, а съответните хроматограми за стеролите и тритерпеновите диалкохоли са изложени на фигура 2.

Алифатните алкохоли се елуират в следния ред: C20-ол (I.S.), C22-ол, C23-ол, C24-ол, C25-ол, C26-ол, C27-ол и C28-ол.

Стеролите и тритерпеновите диалкохоли се елуират в следния ред: холестерол, брасикастерол, ергостерол, 24-метиленхолестерол, кампестерол, кампестанол, стигмастерол, Δ7-кампестерол, Δ5,23-стигмастадиенол, клеростерол, β-ситостерол, ситостанол, Δ5-авенастерол, Δ5,24-стигмастадиенол, Δ7-стигмастенол, Δ7-авенастерол, еритродиол и уваол.

6.5. Количествена преценка

Лицата на пиковете на 1-ейкозанола и на алифатните алкохоли C22, C24, C26 и C28 се изчисляват чрез система за събиране на данни. Коефициентът на чувствителност за 1-ейкозанола се приема за равен на 1.

С помощта на изчислителната система се намира площта на пиковете на α-холестанола и на стеролите и тритерпеновите диалкохоли. Пиковете за всички съединения, които не са включени (ергостеролът не трябва да се изчислява) в таблица 1, не се вземат под внимание. Коефициентът на чувствителност за α-холестанола се приема за равен на 1.

Концентрацията на всяко отделно алкохолно съединение, изразена в mg/kg мастно вещество, се изчислява по следния начин:

$$\textit{Алкохолно съединение } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

където:

A_x = площта на пика на алкохолното съединение x в единиците, използвани от изчислителната система,

A_s = площта на пика на 1-ейкозанола/α-холестанола в единиците, използвани от изчислителната система,

m_s = масата на добавения 1-ейкозанол/α-холестанол в милиграми.

m = масата на използваната за определянето проба в грамове.

7. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Отчитат се отделните концентрации на алифатните и тритерпеновите алкохоли, изразени в mg/kg мастно вещество, както и сборът им като „общо съдържание на алифатни алкохоли“. Общото съдържание е сборът от C22, C24, C26 и C28.

Компонентният състав на всяко отделно алкохолно съединение се изразява до един знак след десетичната запетая.

Общата концентрация на стеролите трябва да бъде изразена без десетична запетая.

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

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

където:

A_x = площта на пика на стерол x.

ΣA = общата площ на пиковете на стеролите.

Привиден β -ситостерол: Δ5,23-стигмастадиенол + клеростерол + β-ситостерол + ситостанол + Δ5-авенастерол + Δ5,24-стигмастадиенол.

Изчислява се процентът на еритродиола и уваола:

$$Еритродиол + \ Уваол = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

където:

A_{Er} = площта на еритродиола в единиците, използвани от изчислителната система,

A_{Uv} = площта на уваола в единиците, използвани от изчислителната система.

Σ_{AT} = сбора на площта на стерола + еритродиола + уваола, използвани от изчислителната система.

Освен изчислението на относителния процент на отделните стероли и тритерпеновите алкохоли, както и на общата коцентрация на стеролите, трябва да се изчислят и концентрацията на еритродиола и уваола и техният сбор, в mg/kg мастно вещество, изразени по следния начин:

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

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

където:

A_{Er} = площта на пика на еритродиола в единиците, използвани от изчислителната система,

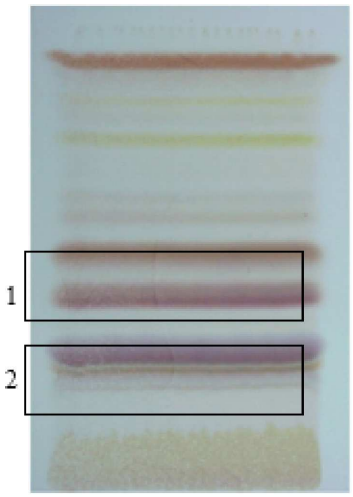
A_{Uv} = площта на уваола в единиците, използвани от изчислителната система.

A_s = площта на пика на α-холестанола в единиците, използвани от изчислителната система.

m_s = масата на добавения α-холестанол в милиграми.

m = масата на използваната за определянето проба в грамове.

Допълнение



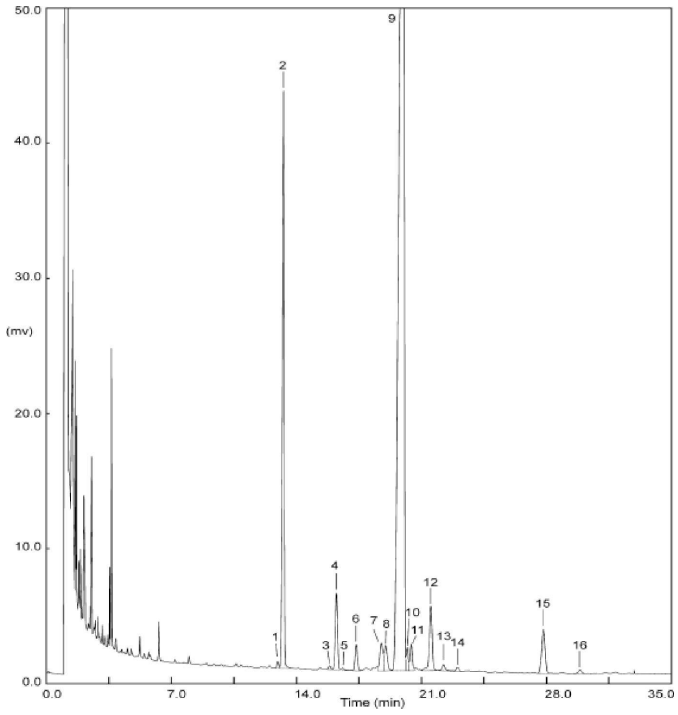
1 Въглеводороди
2 α-токоферол
3 Преноли
4 Тритерпенови алкохоли
5 Алифатни алкохоли
6 Метилови стероли
7 Стероли
8 Тритерпенови диалкохоли

Фигура 1 — Тънкослойна хроматография на неосапуняемата фракция от маслиново масло от остатъчен материал, елуирано двукратно с хексан:диетилов етер (65:35), проявена с SO4H2 (50 %) и нагрята. Ивиците, които трябва да се изтъркат, са намиращите се в правоъгълника; 1 са ивиците на алифатните алкохоли, а 2 са тези на стеролите и тритерпеновите алкохоли.

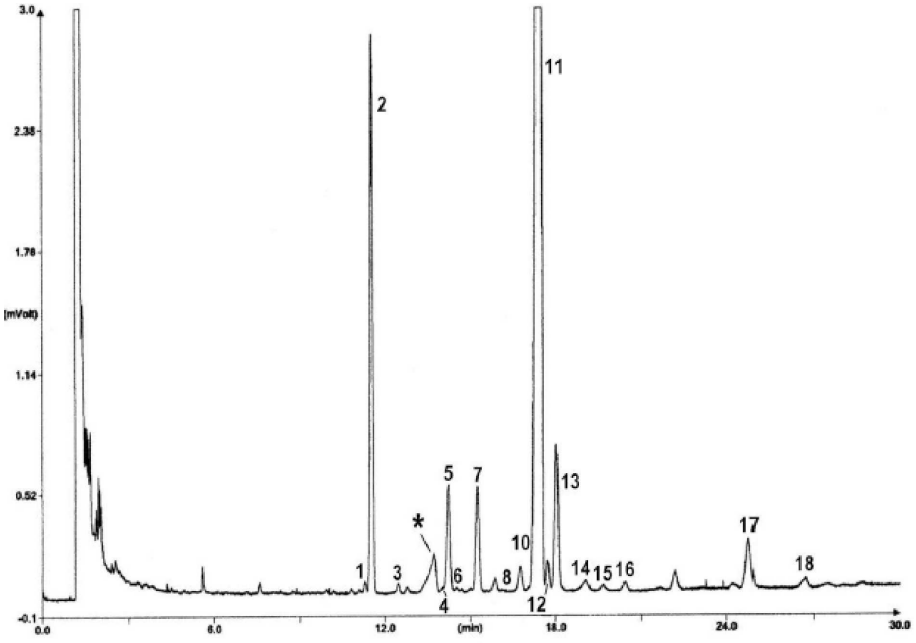
Таблица I — Относително време на задържане на стеролите

Пик	Идентификация		Относително време на задържане	
			SE 54 колона	SE 52 колона
1	Холестерол	Δ-5-холестен-3ß-ол	0,67	0,63
2	Холестанол	5α-холестан-3ß-ол	0,68	0,64
3	Брасикастерол	[24S]-24-метил-Δ-5,22-холестадиен-3β-ол	0,73	0,71
*	Ергостерол	[24S]-24-метил-Δ5,7,22-холестатриен-3β-ол	0,78	0,76
4	24-метилен-холестерол	24-метилен-Δ-5,24-холестадиен-3ß-ол	0,82	0,80
5	Кампестерол	(24R)-24-метил-Δ-5-холестен-3ß-ол	0,83	0,81
6	Кампестанол	(24R)-24-метил-холестан-3ß-ол	0,85	0,82
7	Стигмастерол	(24S)-24-етил-Δ-5,22-холестадиен-3ß-ол	0,88	0,87
8	Δ-7-кампестерол	(24R)-24-метил-Δ-7-холестен-3ß-ол	0,93	0,92
9	Δ-5,23-стигмастадиенол	(24R,S)-24-етил-Δ-5,23-холестадиен-3ß-ол	0,95	0,95
10	Клеростерол	(24S)-24-етил-Δ-5,25-холестадиен-3ß-ол	0,96	0,96

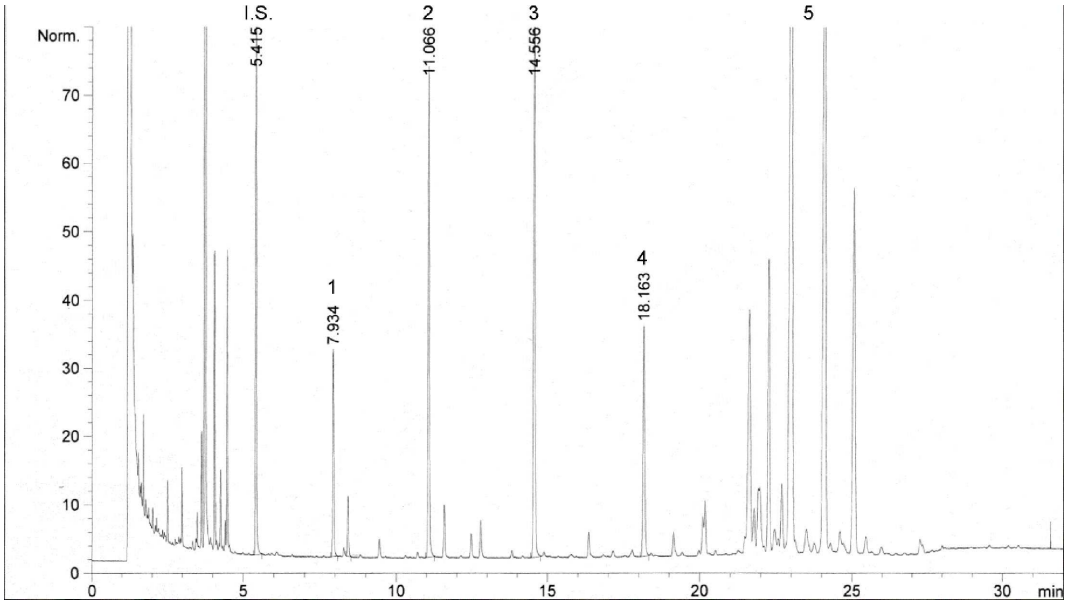
Пик	Идентификация		Относително време на задържане	
			SE 54 колона	SE 52 колона
11	ß-ситостерол	(24R)-24-етил-Δ-5-холестен-3ß-ол	1,00	1,00
12	Ситостанол	24-етилхолестан-3ß-ол	1,02	1,02
13	Δ-5-авенастерол	(24Z)-24-етилиден-Δ-холестен-3ß-ол	1,03	1,03
14	Δ-5,24-стигмастадиенол	(24R,S)-24-етил-Δ-5,24-холестадиен-3ß-ол	1,08	1,08
15	Δ-7-стигмастенол	(24R,S)-24-етил-Δ-7-холестен-3ß-ол	1,12	1,12
16	Δ-7-авенастерол	(24Z)-24-етилиден-Δ-7-холестен-3ß-ол	1,16	1,16
17	Еритродиол	5α-олеан-12-ен-3β,28-диол	1,41	1,41
18	Уваол	Δ12-урсен-3β,28-диол	1,52	1,52



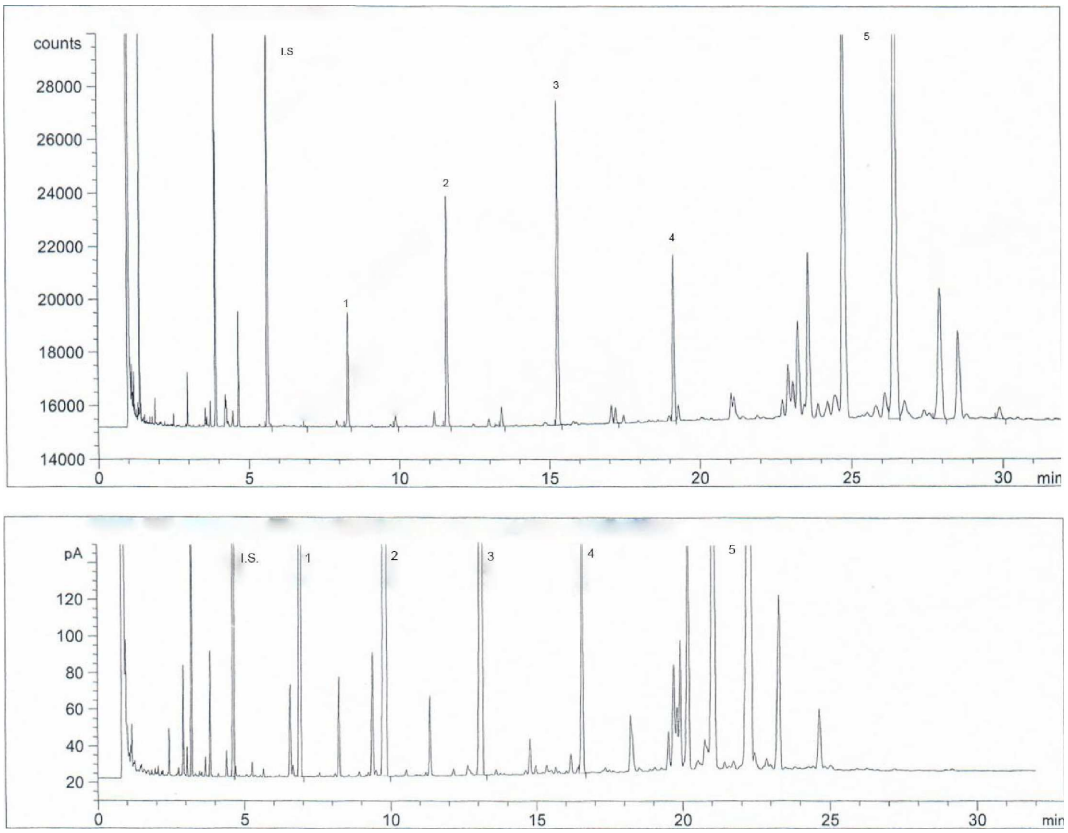
Фигура 2 — ГХ-ПЙД хроматографски профил на стерола и тритерпеновите диалкохоли при рафинираното маслиново масло. (1) Холестерол, (2) α-холестанол (I.S.), (3) 24-метиленхолестерол, (4) кампестерол, (5) кампестанол, (6) стигмастерол, (7) Δ5,23-стигмастадиенол, (8) клеростерол, (9) β-ситостерол, (10) ситостанол, (11) Δ5-авенастерол, (12) Δ5,24-стигмастадиенол, (13) Δ7-стигмастенол, (14) Δ7-авенастерол, (15) еритродиол, (16) уваол.



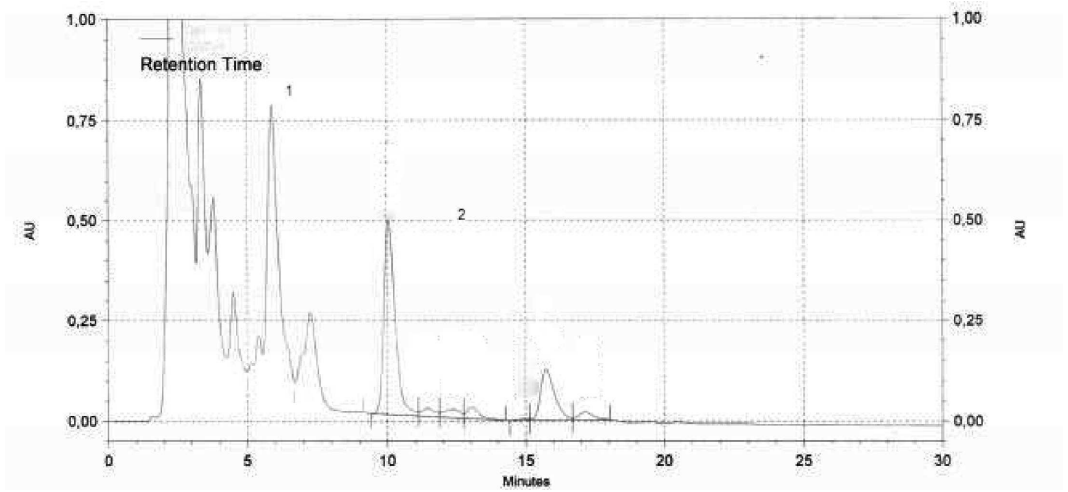
Фигура 3 — ГХ-ПЙД хроматографски профил на стерола и тритерпеновите диалкохоли при маслиновото масло за осветление. (1) Холестерол, (2) α-холестанол, (3) брасикастерол, (4) 24-метиленхолестерол, (5) кампестерол, (6) кампестанол, (7) стигмастерол, (8) Δ7-кампестерол, (9) Δ5,23-стигмастадиенол, (10) клеростерол, (11) β-ситостерол, (12) ситостанол, (13) Δ5-авенастерол, (14) Δ5,24-стигмастадиенол, (15) Δ7-стигмастенол, (16) Δ7-авенастерол, (17) еритродиол, (18) уваол.



Фигура 4 — ГХ-ПЙД хроматографски профил на алифатните алкохоли и тритерпеновите алкохоли при маслиновото масло. (I.S.) C20-ол, (1) C22-ол, (2) C24-ол, (3) C26-ол, (4) C28-ол, (5) тритерпенови алкохоли.



Фигура 5 — ГХ-ПЙД хроматографски профил на алифатните алкохоли и тритерпеновите алкохоли при рафинираното маслиново масло и центрофугираното втори път маслиново масло. (I.S.) C20-ол, (1) C22-ол, (2) C24-ол, (3) C26-ол, (4) C28-ол, (5) тритерпенови алкохоли.



Фигура 6 — ВЕТХ хроматограма на неосапуняемо маслиново масло, отделено чрез ВЕТХ с помощта на ултравиолетов детектор. (1) Алифатни и тритерпенови алкохоли; (2) Стероли и тритерпенови диалкохоли“