

ДОДАТОК І

ХАРАКТЕРИСТИКИ ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ

Якісні характеристики

Категорія	Кислотність (%) (*)	Пероксидне число mEq O ₂ /кг	K ₂₃₂	K ₂₆₈ або K ₂₇₀	Дельта- К	Органолептичне оцінювання		Етилові ефіри жирних кислот (мг/кг)
						Медіана дефекту (Md) (*)	Медіана фруктовності (Mf) (*)	
1. Оливкова олія холодного пресування першого віджиму екстра класу	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Оливкова олія холодного пресування першого віджиму	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Лампова оливкова олія	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (↓)	—	—
4. Рафінована оливкова олія	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16	—	—	—
5. Оливкова олія, що складається з рафінованої	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15	—	—	—

оливкової олії та оливкової олії холодного пресування першого віджиму								
6. Сира оливкова олія з вичавок	—	—	—	—	—		—	—
7. Рафінована оливкова олія з вичавок	$\leq 0,30$	$\leq 5,0$	—	$\leq 2,00$	$\leq 0,20$		—	—
8. Оливкова олія з вичавок	$\leq 1,00$	$\leq 15,0$	—	$\leq 1,70$	$\leq 0,18$		—	—
⁽¹⁾ Медіана дефекту може бути меншою чи дорівнювати 3,5, тоді як медіана фруктовності дорівнює 0,0.								

Характеристики чистоти

Категорія	Склад жирних кислот ⁽¹⁾						Всього трансолеїнових ізомерів (%)	Всього транслінолевих + транслінолевих ізомерів (%)	Стигмастадієни мг/кг ⁽²⁾	Різниця: ECN42 (ВЕРХ) та ECN42 (теоретичний розрахунок)	2-гліцерил монопальмітат (%)
	Міристинова (%)	Ліноленова (%)	Арахінова (%)	Ейкозенова (%)	Бегенова (%)	Лігноциринова (%)					
1. Оливкова олія холодного пресування першого віджиму екстра класу	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 якщо загальний % пальмітинової кислоти ≤ 14,00 % ≤ 1,0 якщо загальний % пальмітинової кислоти ≤ 14,00 %
2. Оливкова	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 якщо

холодного пресування першого віджиму											загальний % пальмітинової кислоти ≤ 14,00 %
6. Сира оливкова олія з вичавок	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,60	≤ 1,4
7. Рафінована оливкова олія з вичавок	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,4
8. Оливкова олія з вичавок	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,2

(¹) Вміст інших жирних кислот (%): пальмітинова: 7,50-20,00; пальмітолеїнова: 0,30-3,50; гептадеканова: ≤ 0,40; гептадеценава: ≤ 0,60; стеаринова: 0,50-5,00; олеїнова: 55,00- 83,00; лінолева: 2,50-21,00.

(²) Загальна кількість ізомерів, які можна (або не можна) розділити капілярною колонкою.

Категорія	Склад стеролів						Усього стероли (мг/кг)	Еритродіол та уваол (%) (**)	Воски мг/кг (**)
	Холестерол (%)	Брасикастерол (%)	Кампестерол (¹) (%)	Стигмастерол (%)	Дод. β-ситостерол (²) (%)	Дельта-7-стигмастенол (¹) (%)			
1. Оливкова олія холодного пресування першого віджиму екстра класу	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150
2. Оливкова олія холодного пресування першого віджиму	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150

3. Лампова оливкова олія	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 300 ⁽³⁾
4. Рафінована оливкова олія	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350
5. Оливкова олія, що складається з рафінованої оливкової олії та оливкової олії холодного пресування першого віджиму	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350
6. Сира оливкова олія з вичавок	≤ 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. Рафінована оливкова олія з вичавок	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350
8. Оливкова олія з вичавок	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ +

C ₄₆ > 350
<p>(¹) Див. доповнення до цього додатка.</p> <p>(²) Дод. β-ситостерол Дельта-5,23-стигмастадієнол + клеростерол + бета-ситостерин + ситостанол + дельта-5-авенастерол + дельта-5,24-стигмастадієнол.</p> <p>(³) Олії, вміст воску в яких складає між 300 мг/кг та 350 мг/кг, вважають ламповою оливковою олією, якщо загальний вміст аліфатичного спирту менший або дорівнює 350 мг/кг або якщо вміст еритродіолу та уваолу менший або дорівнює 3,5%.</p> <p>(⁴) Олії, вміст воску в яких складає між 300 мг/кг та 350 мг/кг, вважають сирою оливковою олією з вичавок, якщо загальний вміст аліфатичного спирту перевищує 350 мг/кг або якщо вміст еритродіолу та уваолу перевищує 3,5%.</p>

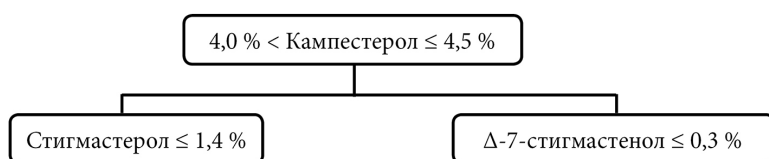
Примітки:

- (a) Результати аналізів необхідно виражати точно з такою ж кількістю знаків після коми, яка використана для кожної характеристики. Останню цифру необхідно збільшувати на один, якщо наступна цифра є більшою 4.
 - (b) Якщо лише одна характеристика не відповідає заявленими значеннями, категорію олії можна змінити або олія буде визнана невідповідною для цілей цього Регламенту.
 - (c) Для лампової оливкової олії обидві характеристики якості, позначені зірочкою (*), можуть одночасно відрізнятися від граничних значень, встановлених для цієї категорії.
 - (d) Якщо характеристику позначено двома зірочками (**), це означає, що для сирої оливкової олії з вичавок обидва відповідні граничні значення можуть відрізнятися від заявлених показників одночасно. Для оливкової олії з вичавок та рафінованої оливкової олії з вичавок одне з відповідних граничних значень може відрізнятися від заявлених значень.
-

Доповнення

Схема прийняття рішень

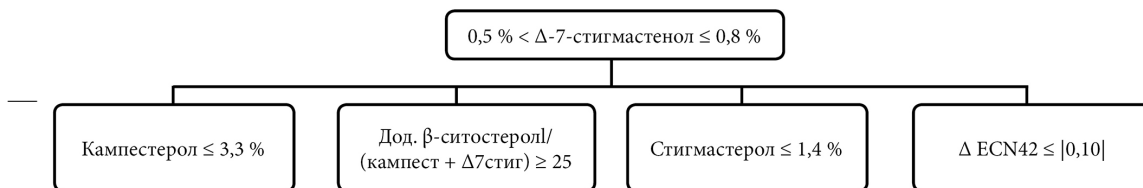
Схема прийняття рішень щодо **кампестеролу** для оливкової олії холодного пресування першого віджиму та оливкової олії холодного пресування першого віджиму екстра класу:



Інші параметри повинні відповідати граничним значенням, встановленим у цьому Регламенті.

Схема прийняття рішень щодо **дельта-7-стигмастенолу** для:

— Оливкової олії холодного пресування першого віджиму та оливкової олії холодного пресування першого віджиму екстра класу



Інші параметри повинні відповідати граничним значенням, встановленим у цьому Регламенті.

— Оливкові олії з вичавок (сирі та рафіновані)



Інші параметри повинні відповідати граничним значенням, встановленим у цьому Регламенті.

▼ M26

ДОДАТОК Ia

ВІДБИРАННЯ ПРОБ ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ АБО ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ З ВИЧАВОК, ЯКА ПОСТАЧАЄТЬСЯ У ПЕРВИННОМУ ПАКОВАННІ

Цей метод відбирання проб застосовують до партій оливкової олії або оливкової олії з вичавок у первинному пакуванні. Різні методи відбирання проб застосовують у залежності від того, чи первинне пакування перевищує 5 літрів чи ні.

«Партія» означає набір одиниць для продажу, які виготовляють, обробляють і пакують в умовах, за яких олію в усіх одиницях партії вважають однорідною за усіма аналітичними характеристиками. Індивідуалізація партії повинна здійснюватися відповідно до Директиви Європейського Парламенту і Ради 2011/91/ЄС (²).

«Інкремент» означає кількість олії, що міститься в первинному пакуванні, взятому з будь-якої частини партії.

1. ВМІСТ ПЕРВИННОГО ЗРАЗКА

1.1. Первинне пакування, що не перевищує 5 літрів

«Первинний зразок» для первинного пакування, що не перевищує 5 літрів, означає кількість одиничних зразків, які взято з партії у відповідності до таблиці 1.

Таблиця 1

Первинний зразок мінімального розміру повинен містити таке

Якщо місткість первинного пакування складає	Первинний зразок повинен містити олію з
(a) 1 літр або більше	(a) 1 первинного пакування;
(b) менше 1 літра	(b) мінімальну кількість пакувань з загальною місткістю щонайменше 1,0 літр

Кількість пакувань, зазначених у таблиці 1, які повинні складати первинний зразок, може бути збільшена кожною державою-членом відповідно до її власних потреб (наприклад для органолептичного оцінювання лабораторією, відмінною від тієї, що здійснювала хімічний аналіз, зустрічний аналіз тощо).

1.2. Первинне пакування перевищує 5 літрів

«Первинний зразок» для первинного пакування, що перевищує 5 літрів, означає репрезентативну частину всіх одиничних зразків, отриманих у процесі зменшення і у відповідності до таблиці 2. Первинний зразок повинен складатися з різних прикладів.

«Приклад» первинного зразка означає кожне пакування, що входить в первинний зразок.

Таблиця 2

Мінімальна кількість одиничних зразків, які слід відібрати

Кількість пакувань у партії	Мінімальна кількість одиничних зразків, які слід відібрати
До 10	1
Від ... 11 до 150	2
Від ... 151 до 500	3
Від ... 501 до 1 500	4
Від ... 1 501 до 2 500	5
> 2 500 на 1 000 пакувань	1 додатковий одиничний зразок

Для того, щоб зменшити об'єм первинного пакування зразків, вміст відібраних одиничних проб гомогенізують для приготування первинного зразка. Порції різних одиничних зразків виливають у загальний контейнер для гомогенізування шляхом змішування, щоб краще захистити їх від доступу повітря.

Вміст первинного зразка необхідно перелити до ряду пакувань мінімальною місткістю 1,0 літр, кожне з яких є прикладом первинного зразка.

Кожна держава-член може збільшити кількість первинних зразків, відповідно до власних потреб (наприклад, для органолептичного оцінювання лабораторією, відмінною від тієї, що здійснювала хімічний аналіз, зустрічні аналізи тощо).

Кожне пакування необхідно наповнити таким чином, щоб шар повітря над зразком був якомога меншим, а потім надійно закрити і запечатати його, щоб забезпечити захист продукту від втручання.

Ці приклади необхідно маркувати для забезпечення правильної ідентифікації.

2. АНАЛІЗИ ТА РЕЗУЛЬТАТИ

▼ M32

2.1. Кожен первинний зразок необхідно розділити на лабораторні зразки згідно з пунктом 2.5 стандарту EN ISO 5555 та проаналізувати відповідно до порядку, наведеного у схемі прийняття рішень у додатку Ib або в будь-якому іншому довільному порядку.

▼ M26

2.2. Якщо результати аналізів відповідають характеристикам заявленої категорії олії, усю партію визнають відповідною.

Якщо один результат аналізів не відповідає характеристикам заявленої категорії олії, всю партію визнають невідповідною.

3. ПЕРЕВІРКА КАТЕГОРІЇ ПАРТІЇ

3.1. Для того щоб перевірити категорію партії, компетентний орган може збільшити кількість відібраних первинних зразків з різних частин партії, відповідно до наведеної нижче таблиці:

Таблиця 3

Кількість первинних зразків відповідно до обсягу партії

Розмір партії (літри)	Кількість первинних зразків
Менше 7 500	2
Від 7 500 до менше 25 000	3
Від 25 000 до менше 75 000	4
Від 75 000 до менше 125 000	5
Більше або дорівнює 125 000	6 + 1 на кожні додаткові 50 000 літрів

Кожний одиничний зразок, що складає початковий зразок, повинен бути відібраний з суцільної частини партії; необхідно фіксувати місце збору кожного первинного зразка та однозначно його ідентифікувати.

Формування кожного первинного зразка здійснюють відповідно до процедур, зазначених у пунктах 1.1 та 1.2.

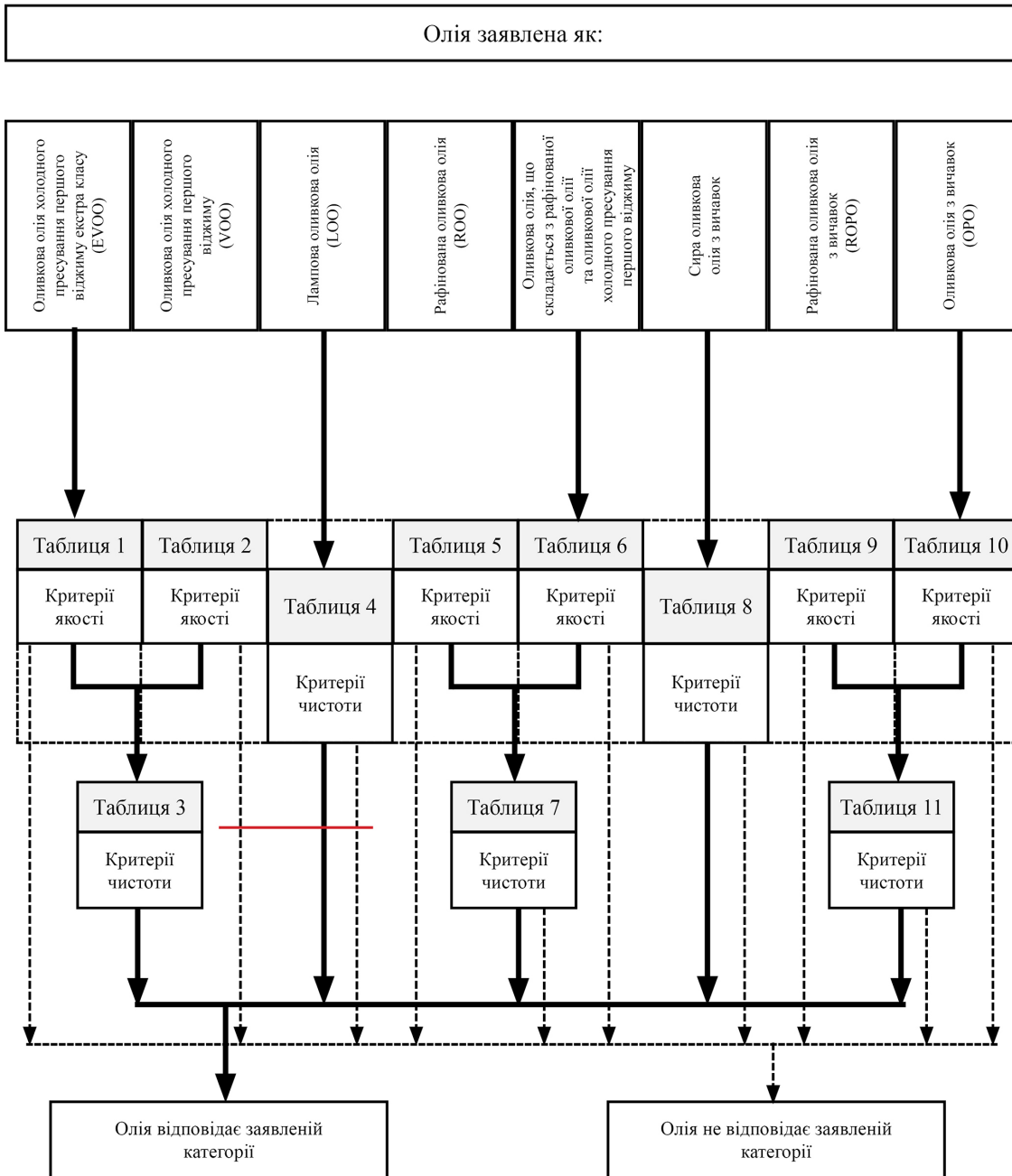
Кожен первинний зразок піддають аналізу, зазначеному в статті 2(1).

3.2. Якщо один з результатів аналізів, зазначених у статті 2(1), щонайменше одного первинного зразка не відповідає характеристикам заявленої категорії олії, всю відібрану партію визнають невідповідною.

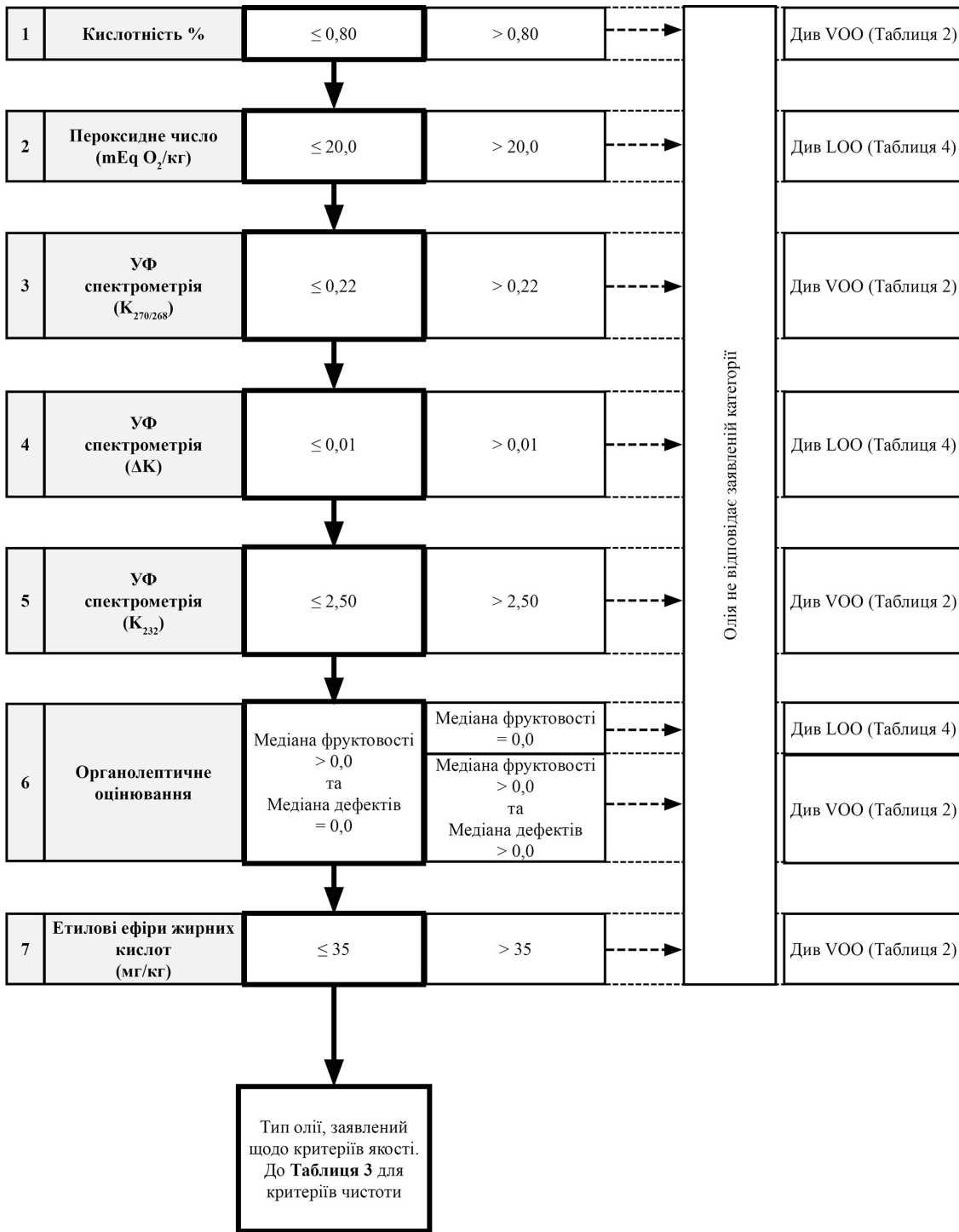
▼ M32

БЛОК-СХЕМА ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ВІДПОВІДНОСТІ ЗРАЗКА ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ ЗАЯВЛЕНІЙ КАТЕГОРІЇ

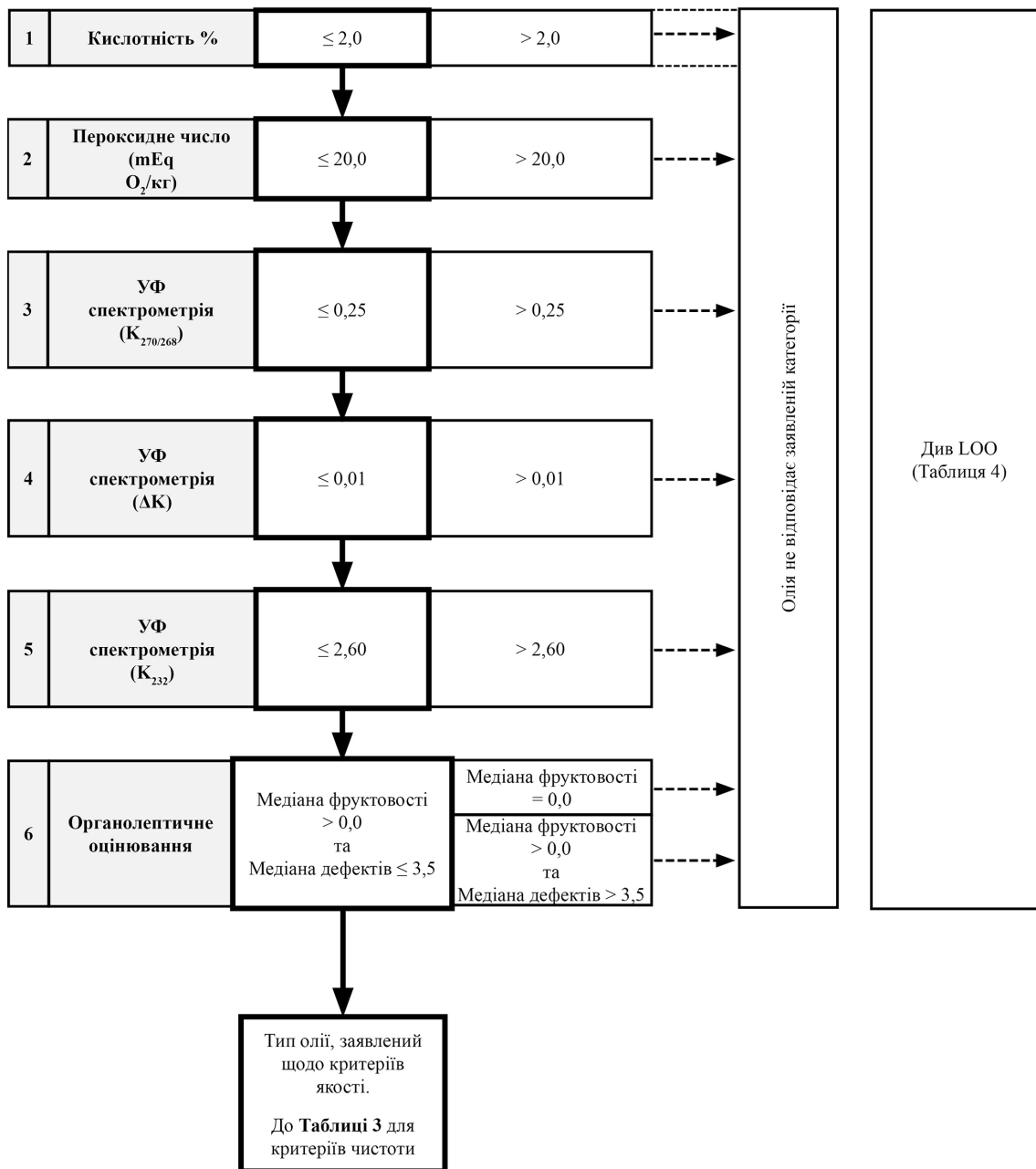
Загальна таблиця



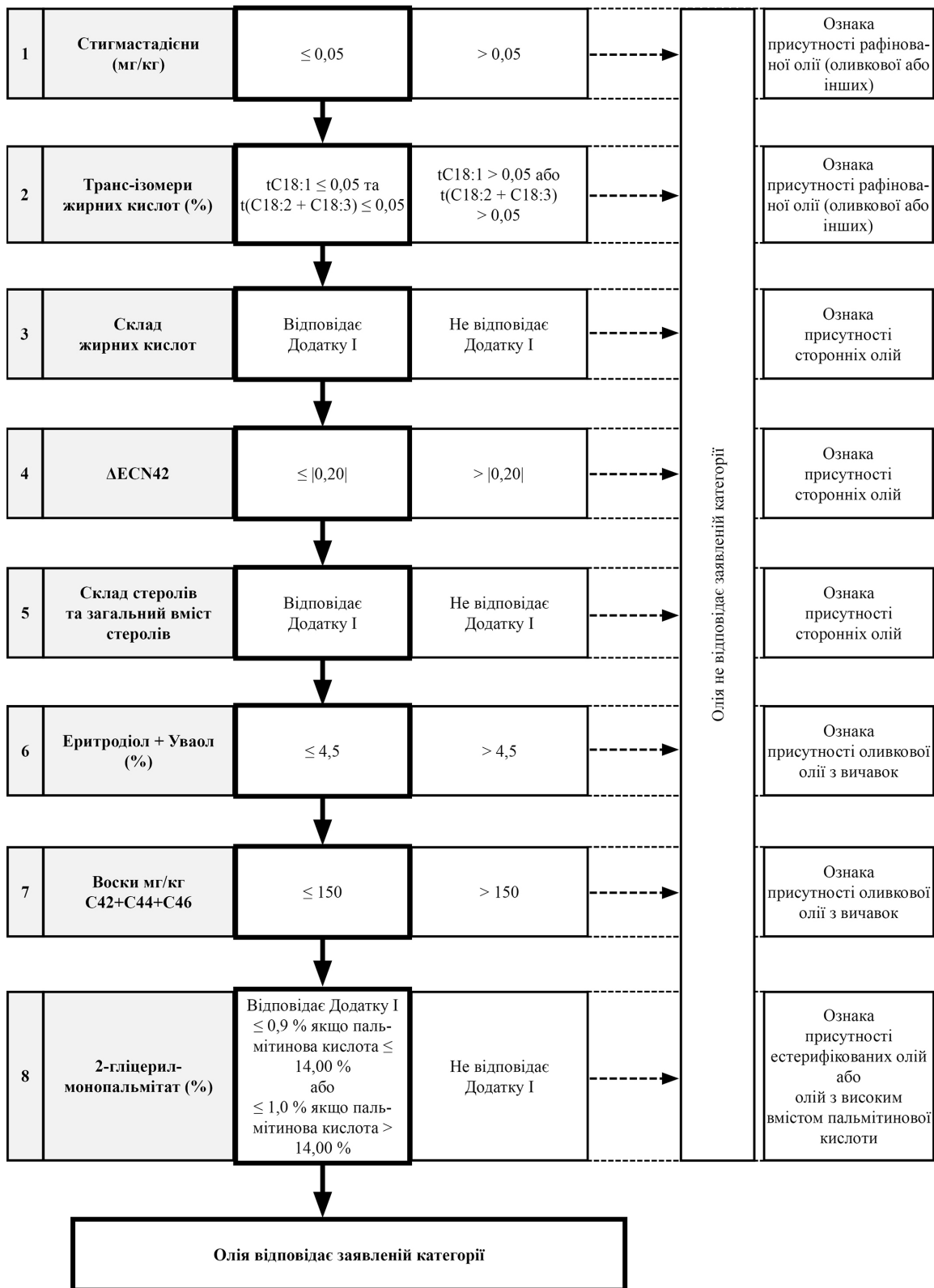
Таблиця 1 — Оливкова олія холодного пресування першого віджиму екстра класу — Критерії якості

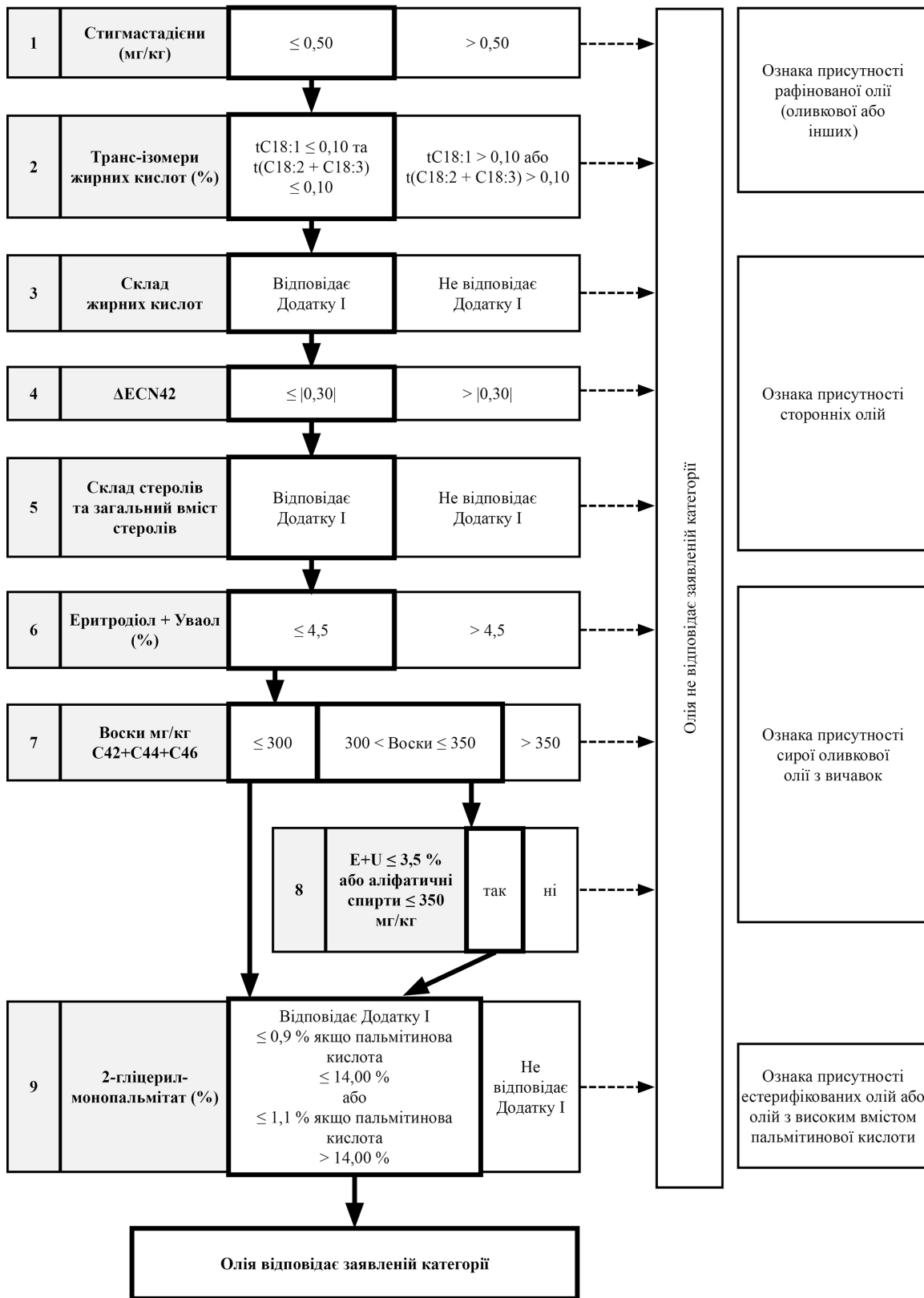


Таблиця 2 — Оливкова олія холодного пресування першого віджиму — Критерії якості

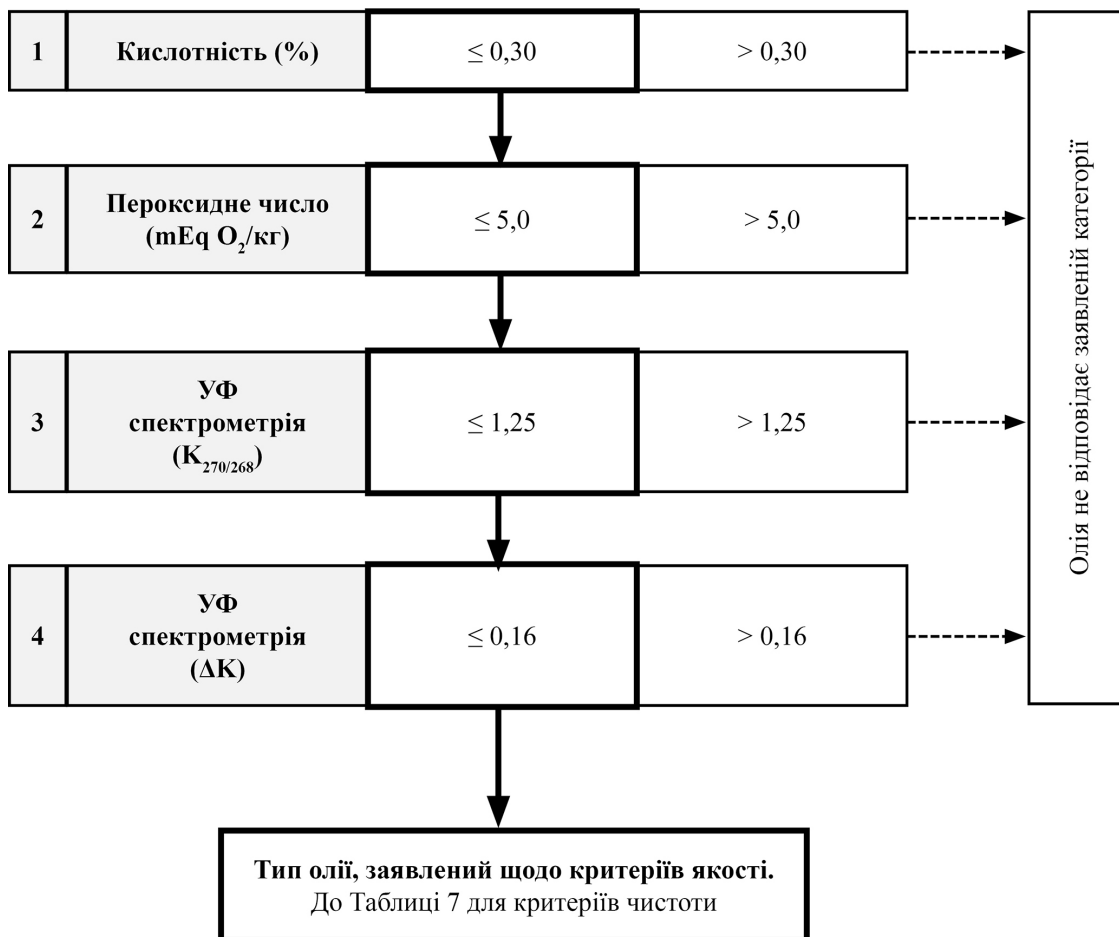


Таблиця 3 — Оливкова олія холодного пресування першого віджиму екстра класу та оливкова олія холодного пресування першого віджиму — Критерії чистоти

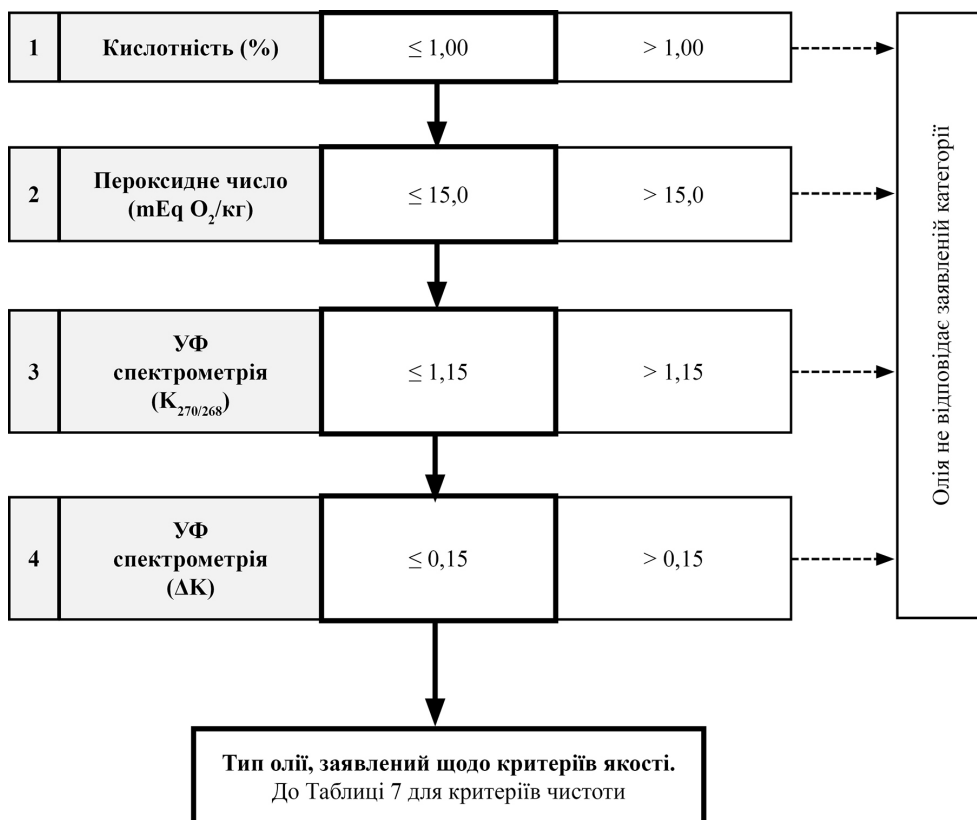




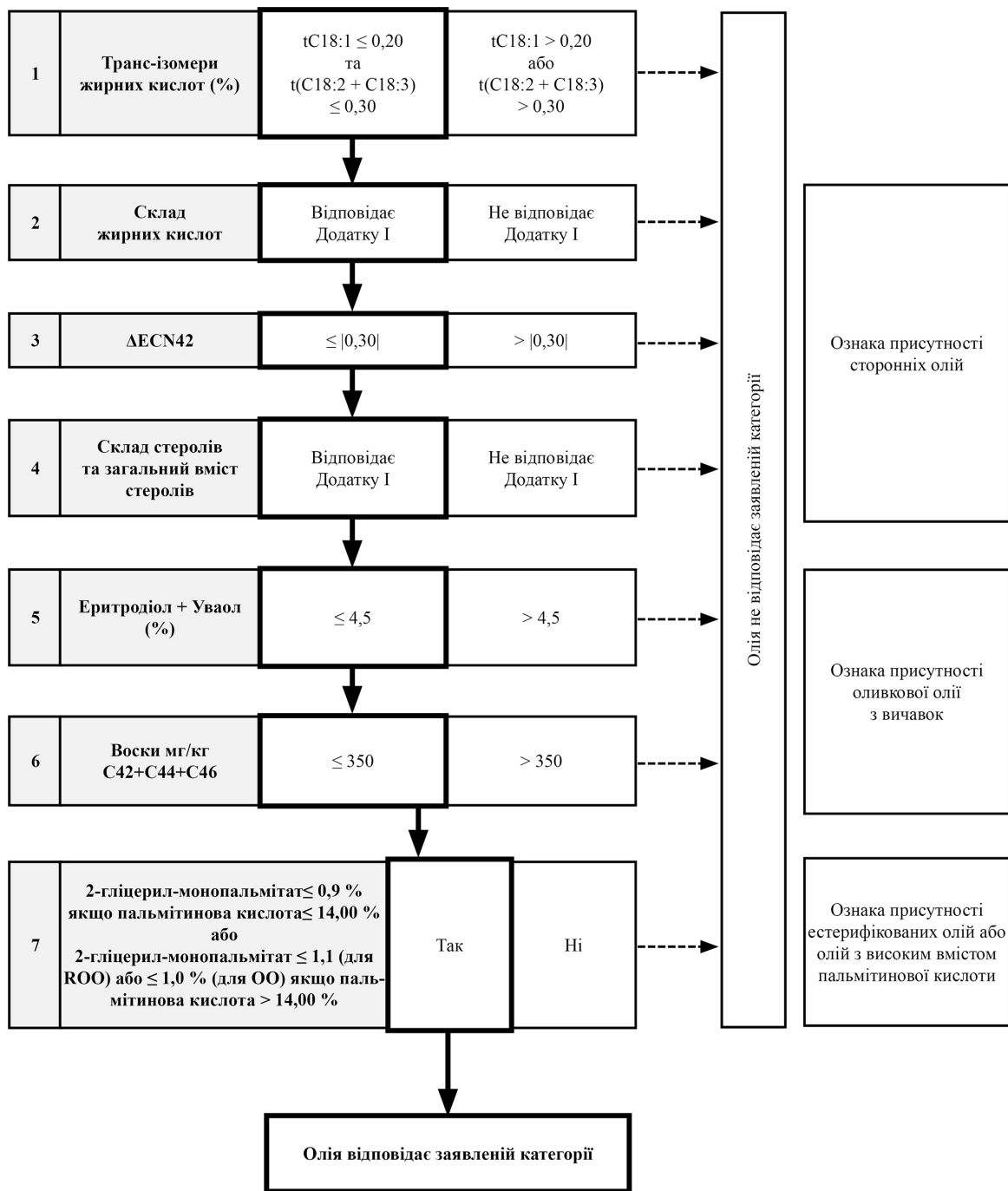
Таблиця 5 — Рафінована оливкова олія — Критерії якості



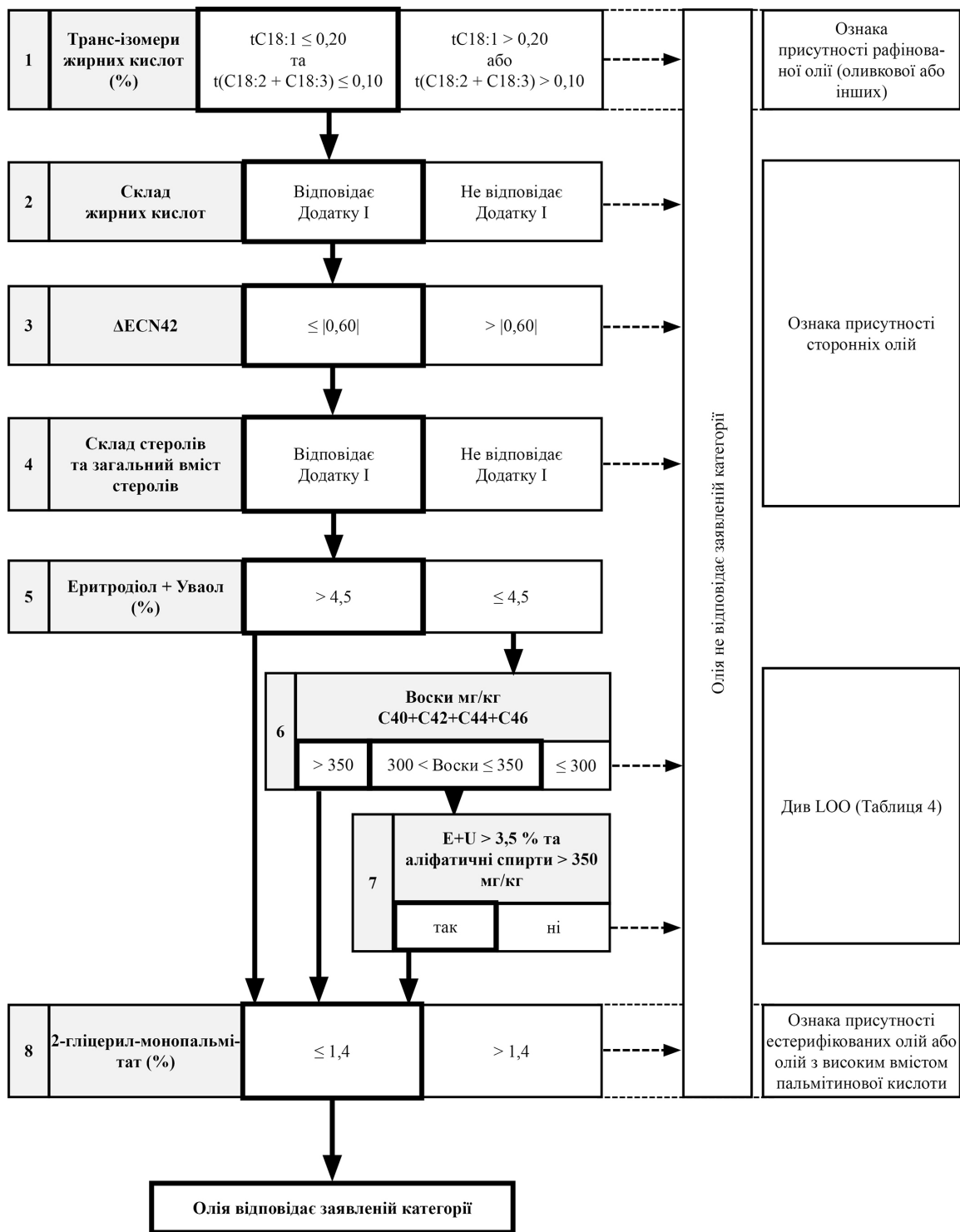
Таблиця 6 — Оливкова олія, що складається з рафінованої оливкової олії та оливкової олії холодного пресування першого віджиму — Критерії якості



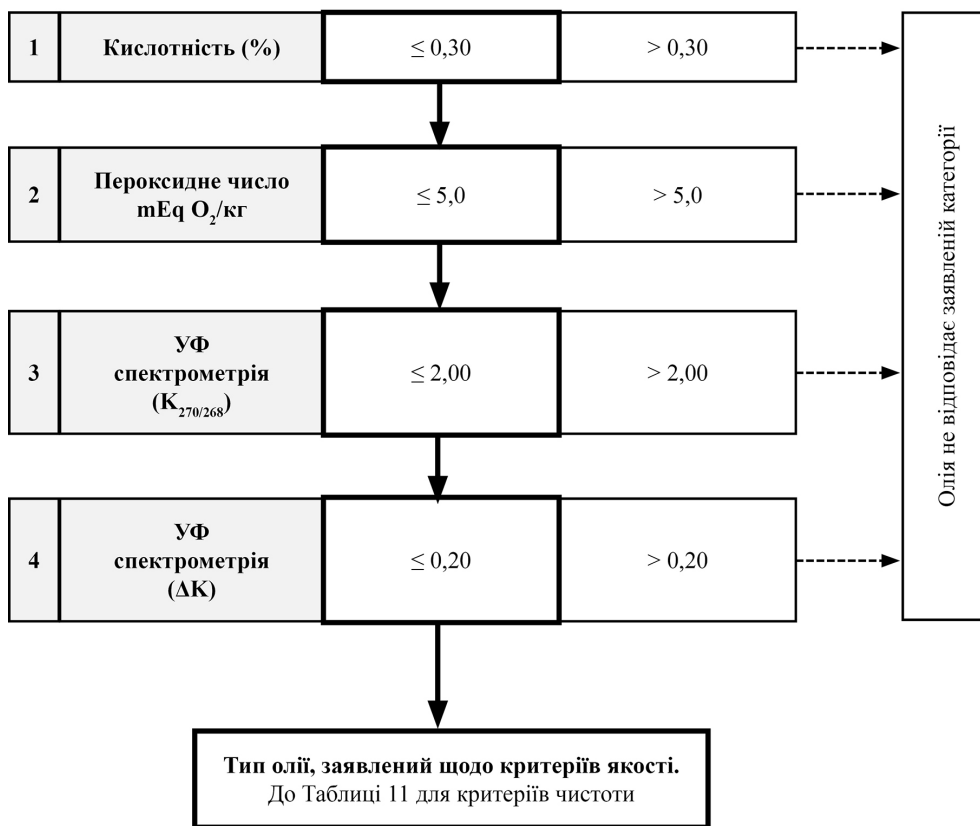
Таблиця 7 — Рафінована оливкова олія та оливкова олія, що складається з рафінованої оливкової олії та оливкової олії холодного пресування першого віджиму — Критерії чистоти



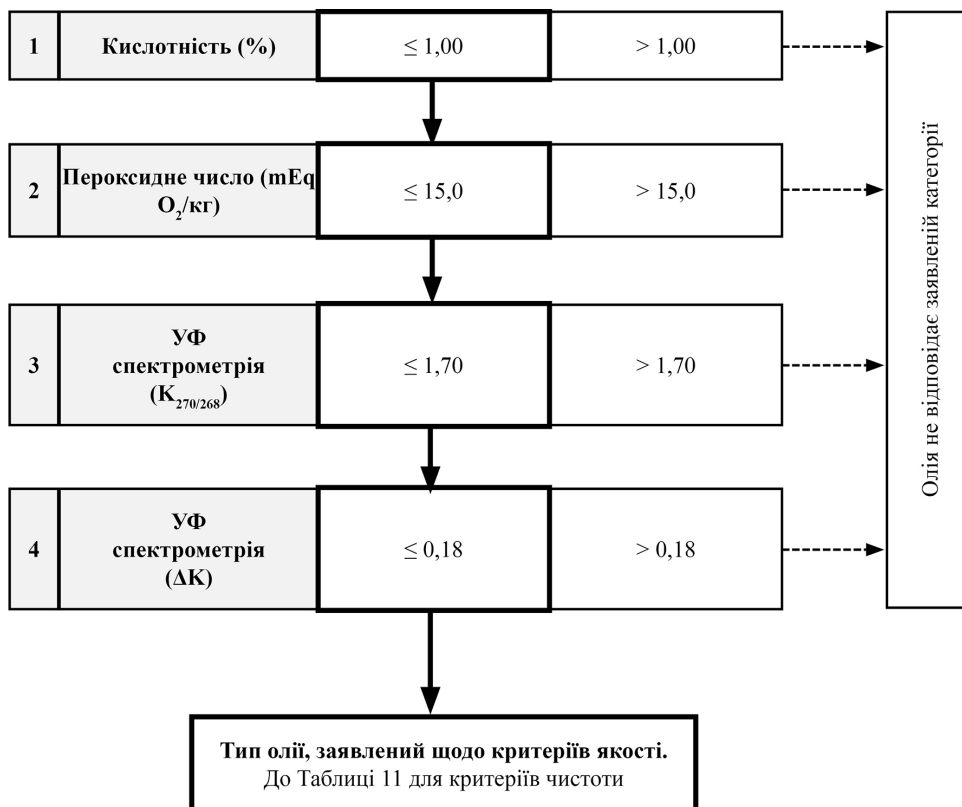
Таблиця 8 — Сира оливкова олія з вичавок — Критерії чистоти



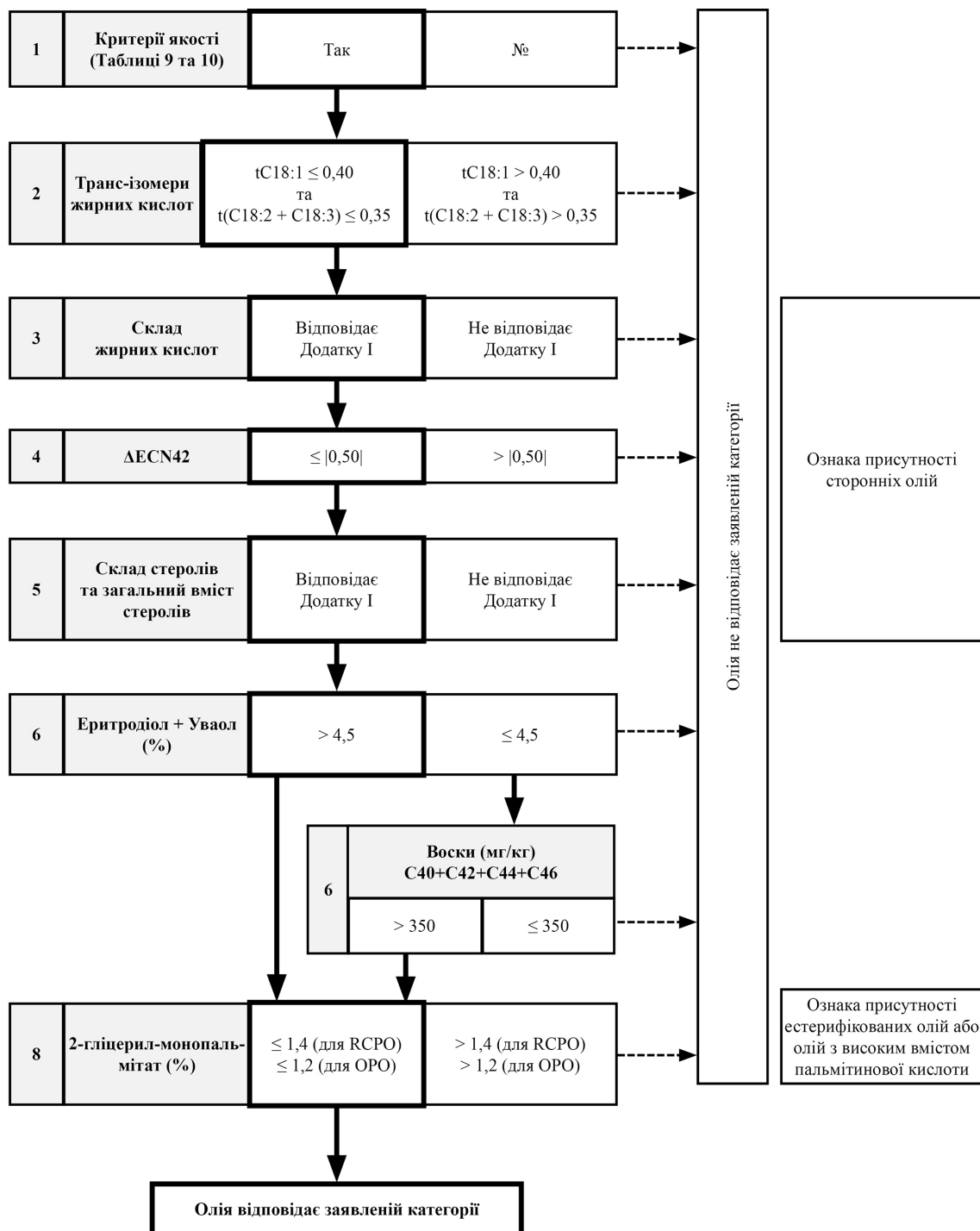
Таблиця 9 — Рафінована оливкова олія з вичавок — Критерії якості



Таблиця 10 — Оливкова олія з вичавок — Критерії якості



Таблиця 11 — Рафінована оливкова олія з вичавок та оливкова олія з вичавок — Критерії чистоти



▼ M29

ДОДАТОК II

ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ, ХОЛОДНИЙ МЕТОД

1. СФЕРА ОХОПЛЕННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ

Цей метод описує визначення вільних жирних кислот в оливкових оліях та оливкових оліях з вичавок. Вміст вільних жирних кислот виражають у перерахунку як кислотність, розраховану як відсоток олеїнової кислоти.

2. ПРИНЦИП

Зразок розчиняють у суміші розчинників і титрують наявні вільні жирні кислоти, використовуючи розчин гідроксиду калію або гідроксиду натрію.

3. РЕАГЕНТИ

Усі реагенти мають бути визнаної аналітичної якості, а вода, що використовується, повинна бути або дистильована, або мати аналогічний рівень чистоти.

3.1 Діетиловий ефір; 95% етанол (об/об), суміш рівних за об'ємом частин.

Нейтралізувати точно в момент використання розчином гідроксиду калію (3.2), з додаванням 0,3 мл розчину фенолфталеїну (3.3) на 100 мл суміші.

Примітка 1: Діетиловий ефір є легкозаймистою речовиною і може утворювати вибухонебезпечні пероксиди. При його використанні необхідно проявляти особливу обережність.

Примітка 2: Якщо неможливо використати діетиловий ефір, можна використовувати суміш розчинників, що містять етанол та толуен. За необхідності етанол можна замінити пропанолом-2.

3.2 Гідроксид калію або гідроксид натрію, титрований етаноловий або водний розчин, с(КОН) [або с(NaOH)] у концентрації 0,1 моль/л або, за необхідності, с(КОН) [або с(NaOH)] приблизно 0,5 моль/л. Готові розчини доступні в продажу.

Точна концентрація розчину гідроксиду калію (або розчину гідроксиду натрію) має бути відома і перевірена перед використанням. Використовуйте розчин, підготований щонайменше за п'ять днів до використання і декантований у коричневу скляну пляшку з гумовою пробкою. Розчин повинен бути безбарвним або солом'яного кольору.

Якщо спостерігається розділення фаз при використанні водного розчину гідроксиду калію (або гідроксиду натрію), водний розчин слід замінити розчином етанолу.

Примітка 3: Стійкий безбарвний розчин гідроксиду калію (або гідроксиду натрію) можна приготувати таким чином. Довести до кипіння 1 000 мл етанолу або води з 8 г гідроксиду калію (або гідроксиду натрію) та 0,5 г алюмінієвої стружки і продовжувати кип'ятити зі зворотним холодильником впродовж години. Відразу ж дистилювати. Розчинити у дистилаті необхідну кількість гідроксиду калію (або гідроксиду натрію). Залишити на кілька днів і декантувати надосадову рідину з осаду карбонату калію (або карбонату натрію).

Розчин можна також виготовляти без дистилювання таким чином: до 1 000 мл етанолу (або води) додати 4 мл бутилату алюмінію та залишити суміш на кілька днів. Декантувати надосадову рідину та розчинити необхідну кількість гідроксиду калію (або гідроксиду натрію). Розчин готовий до використання.

3.3 Фенолфталеїн, розчин 10 г/л в 95-96% етанолі (об/об) або лужний блакитний 6В чи тимолфталеїн, розчин 20 г/л у 95-96% етанолі (об/об). У випадку сильно забарвлених олій слід використовувати лужний блакитний або тимольфталеїн.

4. ПРИЛАДИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Звичайне лабораторне обладнання, включаючи:

4.1 Аналітичні ваги;

4.2 Конічна колба об'ємом 250 мл;

4.3 Бюретка, клас А, об'ємом 10 мл, зі шкалою 0,05 мл або аналогічна автоматична бюретка.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1 Готування випробного зразка

Якщо зразок мутний, його необхідно відфільтрувати.

5.2 Відібрана проба

Взяти зразок залежно від передбачуваної кислотності відповідно до наступної таблиці:

Очікувана	Маса зразка (г)	Точність зважування (г)
-----------	-----------------	-------------------------

кислотність (вміст олеїнової кислоти г/100 г)		
від 0 до 2	10	0,02
> від 2 до 7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0 001

Зважити зразок у конічній колбі (4.2).

5.3 Визначення

Розчинити зразок (5.2) в 50-100 мл попередньо нейтралізованої суміші діетилового ефіру та етанолу (3.1).

Титрувати при перемішуванні 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію (або гідроксиду натрію) (3.2) (див. примітку 4), до зміни індикатора (колір кольорового індикатора зберігається щонайменше 10 секунд).

Примітка 4: Якщо необхідна кількість 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію (або гідроксиду натрію) перевищує 10 мл, слід використати розчин 0,5 моль/л або змінити масу зразка відповідно до очікуваної вільної кислотності і запропонованої таблиці.

Примітка 5: Якщо розчин стає каламутним під час титрування, слід додати достатню кількість розчинників (3.1), щоб утворився прозорий розчин.

Друге визначення слід проводити лише в тому випадку, якщо перший результат перевищує встановлене граничне значення для категорії олії.

6. ВИРАЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Кислотність як відсоток олеїнової кислоти за масою рівний:

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

де:

- V = об'єм титрованого розчину гідроксиду калію (та гідроксиду натрію), в мілілітрах;
 c = точна концентрація у молях на літр використаного титрованого розчину гідроксиду калію (або гідроксиду натрію);
 M = 282 г/моль, молярна маса в грамах на моль олеїнової кислоти;
 m = маса зразка в грамах.

Вміст олеїнової кислоти зазначають таким чином:

- (а) до двох знаків після коми для об'ємів від 0 до 1 включно;
 (а) до одного знаку після коми для об'ємів від 1 до 100 включно;

▼ M30

ДОДАТОК III

ВИЗНАЧЕННЯ ПЕРОКСИДНОГО ЧИСЛА

1. Сфера застосування

У цьому додатку описаний метод визначення пероксидного числа в тваринних і рослинних жирах та оліях.

2. Означення

Пероксидне число це кількість таких речовин у зразку, виражена у міліеквівалентах активного кисню на кілограм, які окиснюють йодид калію в описаних робочих умовах.

3. Принцип

Обробка відібраної проби у розчині оцтової кислоти та хлороформу розчином йодиду калію. Титрування вивільненого йоду стандартизованим розчином тіосульфату натрію.

4. Прилади та обладнання

Усе використовуване обладнання повинно бути вільним від редуруючих або окислюючих речовин.

Примітка 1: Не змащувати поверхні.

- 4.1 скляна лопатка ємністю 3 мл.
- 4.2. Колби з притертими горловинами та пробками, ємністю близько 250 мл, попередньо висушені та наповнені чистим сухим інертним газом (азотом або, бажано, діоксидом вуглецю).
- 4.3. Бюретка об'ємом 5 мл, 10 мл або 25 мл, градуйована щонайменше по 0,05 мл, бажано з автоматичним налаштуванням на нуль, або еквівалентна автоматична бюретка.
- 4.4 Аналітичні ваги;

5. Реагенти

- 5.1. Хлороформ, хімічно чистий реагент, позбавлений кисню шляхом пропускання крізь нього струменя чистого сухого інертного газу.
- 5.2. Льодяна оцтова кислота, хімічно чистий реагент, звільнений від кисню шляхом пропускання крізь нього струменя чистого сухого інертного газу.
- 5.1. Йодид калію, насичений водний розчин, щойно приготований, не містить йоду та йодатів. Розчинити приблизно 14 г йодиду калію в приблизно 10 мл води за кімнатної температури.
- 5.4. Тіосульфат натрію, 0,01 моль/л (еквівалент 0,01 N), точно стандартизований водний розчин, стандартизований безпосередньо перед використанням.

Перед використанням щодня спочатку готують 0,01 моль/л розчину тіосульфату натрію із стандартного розчину 0,1 моль/л тіосульфату натрію або визначають точну молярність. Як свідчить досвід, стійкість обмежена і залежить від значення рН та вмісту вільного діоксиду вуглецю. Для розбавлення використовувати лише щойно доведену до кипіння воду, за можливості — очищену азотом.

Наведена нижче процедура рекомендована для визначення точної молярності розчину тіосульфату натрію:

Зважити, з точністю до 0,001 г, від 0,27 до 0,33 г йодату калію (m_{KIO_3}) в мірній колбі (250 мл або 500 мл), розбавити до мітки водою, щойно доведеною до кипіння (V_2) та охолодженою до кімнатної температури. За допомогою піпетки перенести 5 мл або 10 мл цього розчину йодату калію (V_1) в колбу Ерленмеєра об'ємом 250 мл. Додати 60 мл щойно доведеної до кипіння води, 5 мл соляної кислоти концентрацією 4 моль/л, та від 25 мг до 50 мг йодиду калію або 0,5 мл насиченого розчину йодиду калію. Титрувати розчин розчином тіосульфату натрію (V_3) для визначення точної молярності розчину тіосульфату натрію.

$$T = \frac{m_{\text{KIO}_3} \times V_1 \times 6 \times 10 \times w_{\text{KIO}_3}}{M_{\text{KIO}_3} \times V_2 \times V_3}$$

Де

m_{KIO_3} — маса йодату калію, в грамах

V_1 — об'єм розчину йодату калію, в мілілітрах (5 мл або 10 мл)

V_2 — загальний об'єм розчину йодату калію, в мілілітрах (250 мл або 500 мл)

V_3 — об'єм розчину тіосульфату натрію, в мілілітрах

w_{KIO_3} — чистота йодату калію в г/100 г

M_{KIO_3} — молекулярна маса йодату калію (214 г/моль)

T — точна молярність розчину тіосульфату натрію (моль/л).

5.5. Розчин крохмалю, водна дисперсія 10 г/л, нещодавно приготована з натурального розчинного крохмалю. Також можна використовувати еквівалентні реагенти.

6. Зразок

Необхідно переконатися, що зразок був відібраний та зберігався подалі від світла, тримався у прохолоді та в повністю заповнених скляних ємностях, герметично закритих пробками з матового скла або корку.

7. Процедура

Випробування необхідно проводити при розсіяному денному світлі або при штучному освітленні. Зважити в лопатці (4.1) або, за її відсутності — в колбі (4.2), з точністю до 0,001 г масу зразка згідно з наведеною нижче таблицею, відповідно до очікуваного пероксидного числа:

Очікуване пероксидне число (мекв)	Маса відібраної проби (g)
0-12	5,0-2,0
12-20	2,0-1,2
20-30	1,2-0,8
30-50	0,8-0,5
50-90	0,5-0,3

Відкрити колбу (4.2) та ввести скляну лопатку, що містить відібрану пробу. Додати 10 мл хлороформу (5.1). Швидко розчинити відібрану пробу помішуванням. Додати 15 мл оцтової кислоти (5.2), потім — 1 мл розчину йодиду калію (5.3). Швидко закрити пробкою, збовтувати впродовж хвилини і залишити рівно на 5 хвилин подалі від світла за температури від 15 до 25 °С.

Додати близько 75 мл дистильованої води. Титрувати вивільнений йод розчином тіосульфату натрію (5.4), енергійно збовтуючи, використовуючи розчин крохмалю (5.5) як індикатор.

Провести два визначення на одному і тому ж випробному зразку.

Одночасно провести контрольний дослід. Якщо результат сліпого випробування перевищує 0,05 мл розчину тіосульфату натрію 0,01 N (5.4), замінити забруднені реагенти.

8. Вираження результатів

Пероксидне число (PV), виражене в міліеквівалентах активного кисню на кілограм, визначається за формулою:

$$PV = \frac{V \times T \times 1000}{m}$$

де:

V = кількість мл стандартизованого розчину тіосульфату натрію (5.4), використаного для випробування, скоригована з урахуванням контрольного дослід.

T = точна молярність використаного розчину тіосульфату натрію (5.4.), у моль/л.

m = маса відібраної проби у грамах.

За результат взяти середнє арифметичне двох проведених визначень.

Вказувати результат визначення з точністю до одного знака після коми.

*ДОДАТОК IV***ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВОСКУ ЗА ДОПОМОГОЮ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ НА КАПІЛЯРНІЙ КОЛОНЦІ****1. ПРЕДМЕТ**

Цей метод описує процес визначення вмісту воску в оливкових оліях. Воски розділяють в залежності від кількості їх атомів вуглецю. Цей метод можна використовувати зокрема для розрізнення оливкової олії, отриманої шляхом пресування та отриманої шляхом екстрагування (олія з оливкових залишків).

2. ПРИНЦИП

Додавання відповідного внутрішнього стандарту до жиру або олії, фракціонування за допомогою хроматографії на колонці гідратованого силікагелю. Відновлення за умов випробування фракції, що елююється в першу чергу (полярність якої є меншою від полярності тригліцеридів), потім прямий газовий хроматографічний аналіз з використанням капілярної колонки.

3. ОБЛАДНАННЯ

- 3.1. Колба Ерленмеєра об'ємом 25 мл.
- 3.2. Склона колонка для газової хроматографії, внутрішній діаметр 15,0 мм, довжина — від 30 до 40 см, обладнана краном.
- 3.3. Належний газовий хроматограф з капілярною колонкою, обладнаний системою прямого введення в колонку, що складається з таких компонентів:
 - 3.3.1. Термостатична камера для колонок, оснащена приладом програмування температури.
 - 3.3.2. Холодний інжектор для прямого введення в колонку.
 - 3.3.3. Полум'яно-іонізаційний детектор та конвертер-підсилювач.
 - 3.3.4. Інтегратор з функцією запису, здатний працювати з конвертером-підсилювачем (3.3.3), швидкість реакції не повільніша, ніж 1 секунда, зі змінною швидкістю паперу. (Також можна використовувати комп'ютерні системи, що дозволяють отримувати дані газової хроматографії за допомогою комп'ютера).
 - 3.3.5. Капілярна колонка зі скла або плавленого кварцу, довжиною 8-12 м, із внутрішнім діаметром 0,25-0,32 мм, зсередини вкрита плівкою рідкої фази однорідної товщини від 0,10 до 0,30 мкм. (На ринку доступні рідкі фази типу SE-52 або SE-54, що підходять для таких цілей).
- 3.4. Мікрошприц об'ємом 10 мкл для введення в колонку, оснащений посиленою голкою.
- 3.5. Електричний вібратор.
- 3.6. Ротаційний випарник.
- 3.7. Муфельна піч.
- 3.8. Аналітичні ваги з гарантованою точністю $\pm 0,1$ мг.
- 3.9. Звичайний лабораторний скляний посуд.

4. РЕАГЕНТИ

- 4.1. Силікагель з розміром гранул між 60 та 200 мкм.

Покласти гель у піч за температури 500 °C щонайменше на чотири години. Після охолодження додати 2% води відносно кількості відібраного силікагелю. Добре збовтати, щоб зробити суспензію однорідною.

Зберігати в темряві щонайменше впродовж 12 годин перед використанням.

- 4.2. n-гексан для хроматографії.
- 4.3. Етиловий ефір для хроматографії.
- 4.4. n-гептан для хроматографії.
- 4.5. Стандартний розчин лаурил арахідату 0,1% (м/об) в гексані (внутрішній стандарт). (Також можна використовувати пальмітил пальмітат або міристил стеарат).
 - 4.5.1. Судан 1 (1-феніл-азо-2-нафтолол).
- 4.6. Газ-носії: водень або гелій, чистота для газової хроматографії.
- 4.7. Допоміжні гази:
 - чистий водень для газової хроматографії,
 - чисте повітря для газової хроматографії.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Підготування хроматографічної колонки.

Суспендувати 15 г силікагелю (4.1) в n-гексані (4.2) та ввести його в колонку (3.2). Дати вільно осісти. Завершити осідання за допомогою електричного вібратора (3.5), щоб зробити хроматографічний шар більш однорідним. Перколювати 30 мл n-гексану, щоб усунути будь-які домішки. Використовуючи ваги (3.8), зважити рівно 500 мг зразка в колбу Ерленмеєра об'ємом 25 мл (3.1), додати необхідну кількість внутрішнього стандарту (4.5) відповідно до передбачуваного вмісту воску. Наприклад, додати 0,1 мг лаурил арахідату для оливкової олії та від 0,25 до 0,5 мг — для олії з оливкових залишків. Перемістити підготовлений зразок до хроматографічної колонки, використовуючи дві порції по 2 мл n-гексану (4.2).

Дозволити розчиннику витікати, доки він не досягне 1 мм над верхнім рівнем абсорбенту, потім перколювати ще 70 мл n-гексану, щоб усунути природньо присутні n-алкани. Потім почати хроматографічне елюювання, збираючи 180 мл суміші n-гексану/етилового ефіру (співвідношення 99:1), дотримуючись швидкості потоку близько 15 крапель на кожні 10 секунд. Елюювання зразка необхідно проводити за кімнатної температури $22 \pm 4^\circ\text{C}$.

NB:

- Суміш n-гексану/етилового ефіру (99:1) необхідно готувати кожного дня.
- Для візуальної перевірки правильності елюювання восків до зразка можна додати розчин 100 мкл 1 % Судану у суміш для елюювання. Оскільки барвник має проміжне утримання між воском і тригліцидами, коли забарвлення досягло нижньої частини колонки, елюювання слід призупинити, тому що весь віск буде елюювано.

Висушити фракцію, отриману таким чином, в ротаційному випарнику (3.6.), поки практично весь розчин не буде видалено. Видалити останні 2 мл розчинника за допомогою слабого струменя азоту; додати 2-4 мл n-гептану.

5.2. Аналіз шляхом газової хроматографії

5.2.1. Підготовча робота

Встановити колонку в газовий хроматограф (3.3), приєднавши вхідний отвір до системи колонки, а вихідний отвір — до детектора. Виконати загальну перевірку на апараті газової хроматографії (функціонування газопроводу, ефективність детектора та реєстратора тощо).

Якщо колонку використовують вперше, її необхідно привести в робочий стан. Пропустити невелику порцію газу через колонку, потім ввімкнути апарат газової хроматографії. Поступово нагрівати, поки приблизно через чотири години не буде досягнуто 350°C . Підтримувати таку температуру впродовж щонайменше двох годин, потім привести апарат в робочі умови (встановити потік газу, запалити полум'я, під'єднати до електронного реєстратора (3.3.4), налаштувати температуру камери для колонки, детектор і т. п.) та записувати сигнал з

чутливістю, що принаймні в два рази вища ніж та, що потрібна для аналізу. Базова лінія має бути лінійною, без будь-яких піків, і не має демонструвати жодних відхилень.

Негативне зміщення прямої вказує на те, що з'єднання колонки не щільні; позитивне зміщення прямої вказує на те, що колонка не була достатньою мірою приведена у відповідний стан.

5.2.2. Вибір умов експлуатації

Робочі умови загалом є такими:

— температура колонки:

—

	20 °C/ хвилина		5 °C/ хвилина		20 °C/ хвилина	
Спочатку 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— температура детектора: 350 °C;

— кількість речовини, яку вводять: 1 мкл розчину n-гептану (2-4 мл);

— газ-носії: гелій або водень при правильній лінійній швидкості для обраного газу (див. доповнення);

— чутливість інструменту: підходить для таких умов:

Умови можна змінювати відповідно до характеристик колонки та апарату газової хроматографії, щоб досягнути відділення усіх восків та задовільного розділення піків (див. рисунок); час утримання внутрішнього стандарту C₃₂ має становити 18 ± 3 хв. Найбільш показовий пік воску має становити щонайменше 60% від усієї шкали.

Встановити параметри інтеграції піку таким чином, щоб отримати точну оцінку площ розглянутих піків.

NB: З огляду на високу кінцеву температуру, дозволяється позитивне зміщення не більше ніж 10% усієї шкали.

5.3. Проведення аналізу

Відібрати 1 мкл розчину, використовуючи мікросприць 10 мкл; витягнути поршень шприца, щоб голка була порожньою. Помістити голку в інжектор, після 1-2 секунд швидко впорснути; повільно вийняти голку через приблизно п'яти секунд.

Вести запис, доки воски повністю не елюються.

Базова лінія повинна завжди відповідати необхідним умовам.

5.4. Визначення піків

Визначення різних піків має ґрунтуватися на часі утримання речовини шляхом порівняння з сумішами воску з відомим часом утримання, проаналізованими за таких самих умов.

Рисунок є хроматограмою восків оливкової олії холодного пресування першого віджиму.

5.5. Оцінювання кількості

Розрахувати площі піків внутрішнього стандарту та аліфатичних ефірів від C₄₀ до C₄₆, використовуючи інтегратор.

Розрахувати вміст воску кожного з ефірів у мг/кг жиру, використовуючи формулу:

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

де:

- A_x = площа кожного піку ефіру в квадратних міліметрах;
 A_s = площа піку внутрішнього стандарту, в квадратних міліметрах;
 m_s = маса доданого внутрішнього стандарту в міліграмах;
 m = маса зразка, взятого для аналізу, в грамах.

6. ВИРАЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

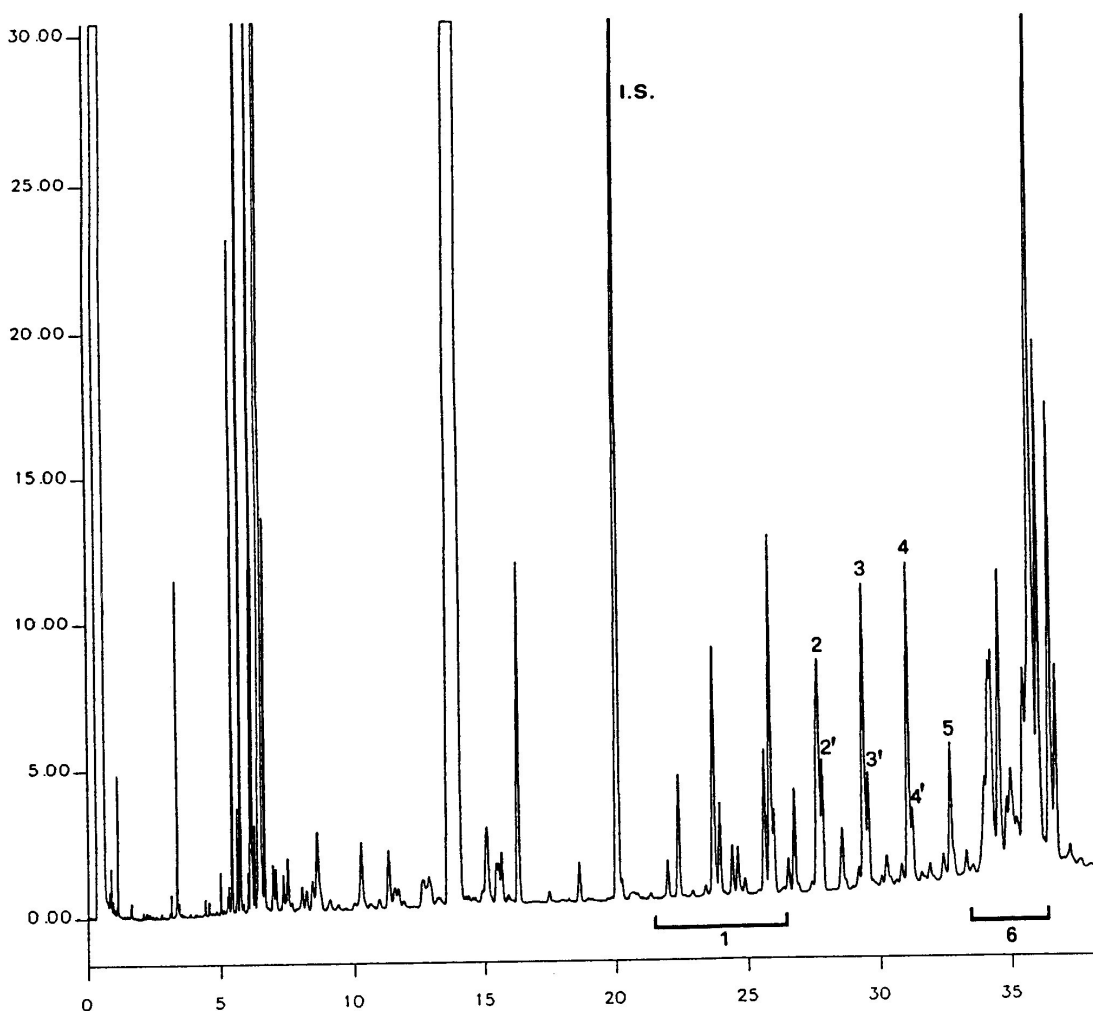
Вказати загальний вміст різних восків від C_{40} до C_{46} в мг/кг жиру (ppm).

NB: Компоненти, кількість яких необхідно визначити, відповідають пікам з номерами пари вуглецю між ефірами C_{40} та C_{46} , з використанням зразка воскової хроматограми оливкової олії, показані на рисунку нижче. Якщо ефір C_{46} з'являється двічі, то рекомендується для його визначення проаналізувати частку воску олії з оливкових залишків, де пік C_{46} легко виявити, оскільки він має чітку кількісну перевагу.

Результати необхідно виразити з точністю до однієї десятої.

Рисунок

Хроматограма восків оливкової олії (³)



Умовні позначення:

- I.S. = Лаурил арахідат
 1. = Дитерпенові ефіри
 2 + 2' = Ефіри C_{40}
 3 + 3' = Ефіри C_{42}
 4 + 4' = Ефіри C_{44}
 5. = Ефіри C_{46}

6. = Стеролові ефіри та тритерпеновий спирт

Доповнення

Визначення лінійної швидкості газу

Ввести 1-3 мкл метану (або пропану) в апарат газової хроматографії після того, як його було налаштовано для нормальних умов експлуатації. Заміряти час, необхідний для того, щоб газ пройшов крізь колонку з моменту його введення та до моменту появи піку (t_M).

Лінійну швидкість см/с визначають за формулою L/t_M , де L — це довжина колонки в см, а t_M — це вимірний час, у секундах.

▼ M32 _____

▼ M26 _____

▼ M21

ДОДАТОК VII

ВИЗНАЧЕННЯ ВІДСОТКА 2-ГЛІЦЕРИЛ МОНОПАЛЬМІТАТУ

1. МЕТА ТА СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Цей метод описує процедуру аналізу для визначення відсотка пальмітинової кислоти в позиції 2 тригліцеридів, шляхом оцінювання 2-гліцерил монопальмітату.

Цей метод можна застосовувати до рідких рослинних олій за температури навколишнього середовища (20 °C).

2. ПРИНЦИП

Після підготування зразок олії піддають дії панкреатинової ліпази: частковий та специфічний гідроліз в позиції 1 та 3 молекули тригліцериду призводить до того, що моногліцериди з'являються у позиції 2. Відсоток 2-гліцерил монопальмітату у фракції моногліцериду визначають після силілування за допомогою газової хроматографії з використанням капілярної колонки.

3. ОБЛАДНАННЯ І МАТЕРІАЛИ

- 3.1. Колба Ерленмеєра об'ємом 25 мл
- 3.2. Мензурки об'ємом 100, 250 та 300 мл
- 3.3. Склояна хроматографічна колонка, з внутрішнім діаметром 21-23 мм, довжиною 400 мм, обладнана склокерамічним диском та краном
- 3.4. Мірні циліндри об'ємом 10, 50, 100 та 200 мл
- 3.5. Колби об'ємом 100 та 250 мл
- 3.6. Ротаційний випарник
- 3.7. Центрифужні пробірки з конічним дном об'ємом 10 мл з пробкою з матового скла
- 3.8. Центрифуга для пробірок об'ємом 10 та 100 мл
- 3.9. Термостат, що дозволяє підтримувати постійну температуру $40 \pm 0,5$ °C
- 3.10. Градуйовані піпетки на 1 та 2 мл

- 3.11. Шприц для підшкірних ін'єкцій об'ємом 1 мл
- 3.12. Мікрошприц об'ємом 100 мкл
- 3.13. Лійка об'ємом 1 000 мл
- 3.14. Капілярний газовий хроматограф з холодним інжектором на колонці для прямого введення зразка в колонку, і піччю, що може підтримувати обрану температуру з точністю до 1 °С
- 3.15. Холодний інжектор на колонці для прямого введення зразка в колонку
- 3.16. Полум'яно-іонізаційний детектор та електрометр
- 3.17. Інтегратор з функцією запису, адаптований до електрометра зі швидкістю реакції не більше 1 с та змінною швидкістю розгортання паперу
- 3.18. Капілярна колонка, виготовлена зі скла або плавленого кварцу, довжиною 8-12 метрів, з внутрішнім діаметром 0,25-0,32 мм, вкрита метилполісилоксаном або 5% феніл метилполісилоксаном, товщиною 0,10-0,30 мкм, яку можна використовувати за температури 370 °С
- 3.19. Мікрошприц об'ємом 10 мкл, обладнаний посиленою голкою довжиною щонайменше 7,5 см для прямого введення до колонки.

4. РЕАГЕНТИ

- 4.1. Силікагель з розміром гранул 0,063-0,200 мм (70/280 меш), приготований таким чином: Помістити силікагель у порцелянову капсулу, сушити в інкубаторі за 160 °С упродовж чотирьох годин, потім дати охолонути за кімнатної температури в ексікаторі. Додати кількість води, рівну 5% маси силікагелю таким чином: Зважити 152 г силікагелю в колбі Ерленмеєра, потім додати 8 г дистильованої води, закрити пробкою, легко збовтати, щоб рівномірно розподілити воду. Залишити відстоюватись впродовж щонайменше 12 годин перед використанням.

▼ M32

- 4.2. n-гексан (для хроматографії). Гексан може бути замінений ізо-октаном (2,2,4-триметилпентан в хроматографії) за умови досягнення порівнюваних значень точності.

▼ M21

- 4.3. Ізопропанол
- 4.4. Ізопропанол, 1/1 (об/об) водний розчин
- 4.5. Панкреатична ліпаза. Вона повинна мати активність 2,0-10 одиниць ліпази на мг. (Панкреатичні ліпази з активністю 2-10 одиниць на мг ензиму доступні в продажу).
- 4.6. Буферний розчин трисгідроксиметиламінометану: Водний розчин 1 М доведений до рН 8 (потенціометричний контроль) концентрованим НСІ (1/1 об/об)
- 4.7. Холат натрію ензимної якості, водний розчин 0,1% (цей розчин необхідно використати впродовж двох тижнів після його приготування)
- 4.8. Хлорид кальцію, водний розчин 22%
- 4.9. Діетиловий ефір для хроматографії
- 4.10. Проявник: суміш n-гексану/діетилового ефіру (87:13 об:об)
- 4.11. Гідроксид натрію, 12% за масою розчину
- 4.12. Фенолфталеїн, розчин 1% в етанолі
- 4.13. Газ-носіє: водень або гелій, для газової хроматографії
- 4.14. Допоміжні гази: водень мінімальною чистотою 99%, без вологи та органічних речовин, і повітря для газової хроматографії, тієї ж самої чистоти
- 4.15. Реагент для силілування: суміш піридину/гексаметилдисилазану, триметилхлоросилан 9/3/1 (об/об/об).

(Готові до використання розчини доступні в продажу. Можна використовувати інші реагенти для силілування, зокрема біс-триметилсиліл трифлуорацетамід + 1 % триметилхлоросилан, розчинені таким же об'ємом безводного піридину).

- 4.16. Порівняльні зразки: чисті моногліцериди або суміші моногліцеридів, відсоток складників яких відомий та є подібним до зразка.

5. МЕТОД

5.1. Підготування зразка

- 5.1.1. Олії із вмістом вільних кислот менше 3% не потрібно нейтралізувати перед хроматографією на колонці силікагелю. Олії із вмістом вільних кислот більше 3% необхідно нейтралізувати відповідно до пункту 5.1.1.1.

5.1.1.1. Налити 50 г олії та 200 мл n-гексану в лійку об'ємом 1 000 мл (3.13). Додати 100 мл ізопропанолу та 12%-ий розчин гідроксиду натрію кількістю (4.11), еквівалентною вмісту вільних кислот в олії плюс 5%. Інтенсивно збовтати впродовж хвилини. Додати 100 мл дистильованої води, повторно збовтати і залишити настоюватись.

Після декантування видалити нижній шар, що містить мила. Видалити будь-які проміжні шари (клейку речовину та нерозчинні речовини). Промити гексановий розчин нейтралізованої олії послідовними порціями 50-60 мл ізопропанолу з водою 1/1 (об/об) (4.4), допоки не зникне рожеве забарвлення фенолфталеїну.

Видалити більшу частину гексану вакуумною дистиляцією (наприклад, використовуючи ротаційний випарник) та перелити олію в колбу об'ємом 100 мл (3.5). Висушити олію у вакуумі, поки розчинник повністю не буде видалений.

Після завершення процедури вміст кислоти в олії повинен становити менше 0,5%.

- 5.1.2. Помістити 1,0 г олії, приготованої як вказано вище, в колбу Ерленмеєра об'ємом 25 мл (3.1) і розчинити в 10 мл проявляючої суміші (4.10). Залишити розчин відстоюватись впродовж щонайменше 15 хвилин перед проведенням хроматографічного аналізу на колонці силікагелю.

Якщо розчин каламутний — відцентрифугувати для забезпечення оптимальних умов для хроматографічного аналізу. (Можна використовувати готові до використання картриджі силікагелю SPE).

- 5.1.3. Підготування хроматографічної колонки

Налити близько 30 мл проявника (4.10) в колонку (3.3), ввести шматочок вати в нижню частину колонки, використовуючи скляну паличку; натиснути, щоб видалити повітря.

У мензурці приготувати суспензію 25 г силікагелю (4.1) в приблизно 80 мл проявника і налити її в колонку, використовуючи лійку.

Перевірити, щоб весь силікагель знаходився у колонці; промити проявником (4.10), відкрити кран та дозволити рідині досягнути рівня приблизно на 2 мм вище рівня силікагелю.

- 5.1.4. Хроматографія на колонці

Зважити точно 1,0 г зразка, підготованого відповідно до пункту 5.1, у колбі Ерленмеєра об'ємом 25 мл (3.1).

Розчинити зразок у 10 мл проявника (4.10). Налити розчин у хроматографічну колонку, підготовану відповідно до пункту 5.1.3. Не чіпати поверхню колонки.

Відкрити кран та налити розчин зразка, доки він не досягне рівня силікагелю. Долити 150 мл проявника. Встановити швидкість потоку 2 мл/хв (так, щоб 150 мл потрапляли до колонки приблизно за 60-70 хвилин).

Відновити елюат в попередньо зваженій колбі на 250 мл. Випарувати розчинник під вакуумом та видалити остаточні залишки розчинника під потоком азоту.

Зважити колбу та обчислити відновлений екстракт.

(Якщо використовуються готові до використання картриджі силікагелю SPE, необхідно використовувати такий метод: Помістити 1 мл розчину (5.1.2) у підготовані картриджі з 3 мл n-гексану.

Після перколяції розчину долити 4 мл n-гексану/діетилового ефіру 9/1 (об/об).

Відновити елюат в пробірці об'ємом 10 мл і випарувати до висихання в під струмом азоту.

Піддати залишок дії панкреатичної ліпази (5.2). (Важливо перевірити склад жирної кислоти перед та після проходження картриджа SPE).

5.2. Гідроліз панкреатичною ліпазою

5.2.1. Зважити в центрифужній пробірці 0,1 г олії, підготованої відповідно до пункту 5.1. Додати 2 мл буферного розчину (4.6), 0,5 мл розчину холату натрію (4.7) та 0,2 мл розчину хлориду кальцію, добре перемішуючи після кожного додавання. Закрити пробірку пробкою з матового скла та помістити в термостат на $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2. Додати 20 мг ліпази, акуратно збовтати (уникати намочання пробки) та помістити пробірку в термостат рівно на дві хвилини. Потім видалити її, інтенсивно збовтати рівно впродовж 1 хвилини та залишити охолоджуватись.

5.2.3. Додати 1 мл діетилового ефіру, закрити пробкою та інтенсивно збовтати, потім центрифугувати та перемістити розчин ефіру у чисту суху пробірку, використовуючи мікрошприц.

5.3 Підготування силанізованих похідних та газової хроматографії

5.3.1. Мікрошприцом ввести 100 мкл розчину (5.2.3) в пробірку з конічним дном об'ємом 10 мл.

5.3.2. Видалити розчинник під легким струменем азоту, додати 200 мкл реагенту для силілування (4.15), закрити пробкою пробірку та залишити настоюватись впродовж 20 хвилин.

5.3.3. Через 20 хвилин додати 1-5 мл n-гексану (в залежності від умов хроматографії): отриманий розчин готовий для газової хроматографії.

5.4. Газова хроматографія

Умови проведення:

— Температура інжектора (інжектор на колонці) нижча ніж точка кипіння розчинника (68 °C);

— Температура детектора: 350 °C;

— Температура колонки: програмування температури печі: 60 °C впродовж 1 хвилини, підвищувати на 15 °C на хвилину до 180 °C, потім на 5 °C на хвилину до 340 °C, потім 340 °C впродовж 13 хвилин;

— Газ-носії: водень або гелій, налаштований на лінійну швидкість, достатню для отримання розділення, відображеного на рисунку 1. Час утримання тригліцериду C_{54} має становити 40 ± 5 хвилин (див. рисунок 2). (Вказані вище робочі умови є орієнтовними. Операторам необхідно буде оптимізувати їх, щоб отримати бажане розділення. Пік, що відповідає 2-гліцерил монопальмітату, повинен мати мінімальну висоту рівну 10% шкали ресстратора).

— Кількість речовини, яку вводять: 0,5-1 мкл розчину n-гексану (5 мл) (5.3.3).

5.4.1. Визначення піків

Окремі моногліцериди визначають за їхнім часом утримання та шляхом порівняння з показниками, отриманими для стандартних моногліцеридних сумішей, проаналізованих за таких самих умов.

5.4.2. Кількісне оцінювання

Площу кожного піку розраховують за допомогою електронного інтегратора.

6. ВИРАЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Відсоток гліцерил монопальмітату обчислюють від співвідношення площі відповідного піку та площ піків усіх моногліцеридів (див. рисунок 2), використовуючи формулу:

гліцерил монопальмітат (%):

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

де:

A_x = площа піку, що відповідає гліцерил монопальмітату

$\sum A$ = сума площ усіх піків моногліцериду

Результат виражають з точністю до одного знаку після коми.

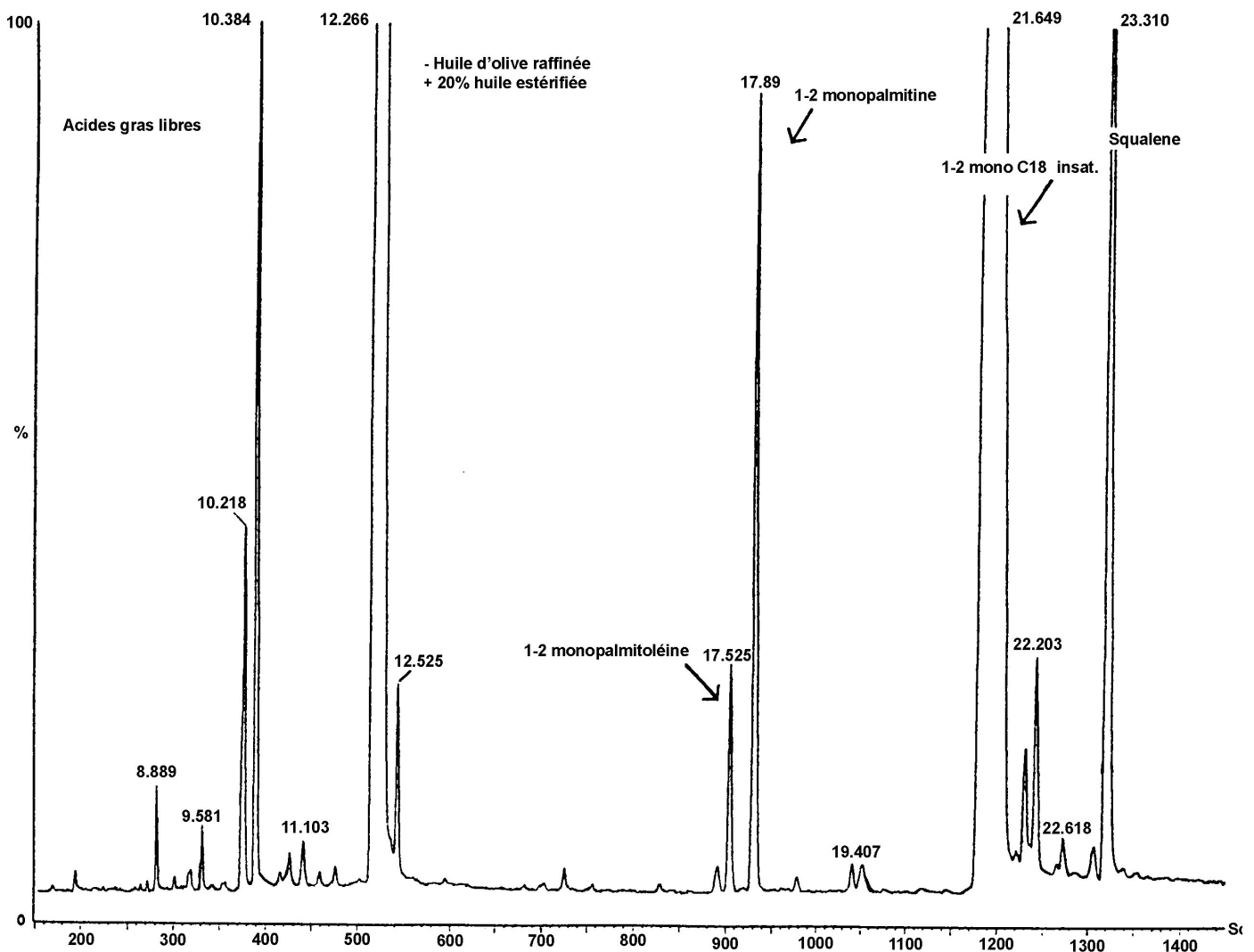
7. АНАЛІТИЧНИЙ ЗВІТ

Аналітичний звіт повинен включати:

- посилання на цей метод,
- усю інформацію, необхідну для повної ідентифікації зразка,
- результат аналізу,
- будь-які відхилення від методу, в результаті рішення відповідних сторін або з іншої причини,
- детальну інформацію для ідентифікації лабораторії, дату аналізу та підписи відповідальних за проведення аналізу.

Рисунок 1

Хроматограма продуктів реакції силанізації, отриманих під дією ліпази на рафіновану оливкову олію з додаванням 20% естерифікованої олії (100%)



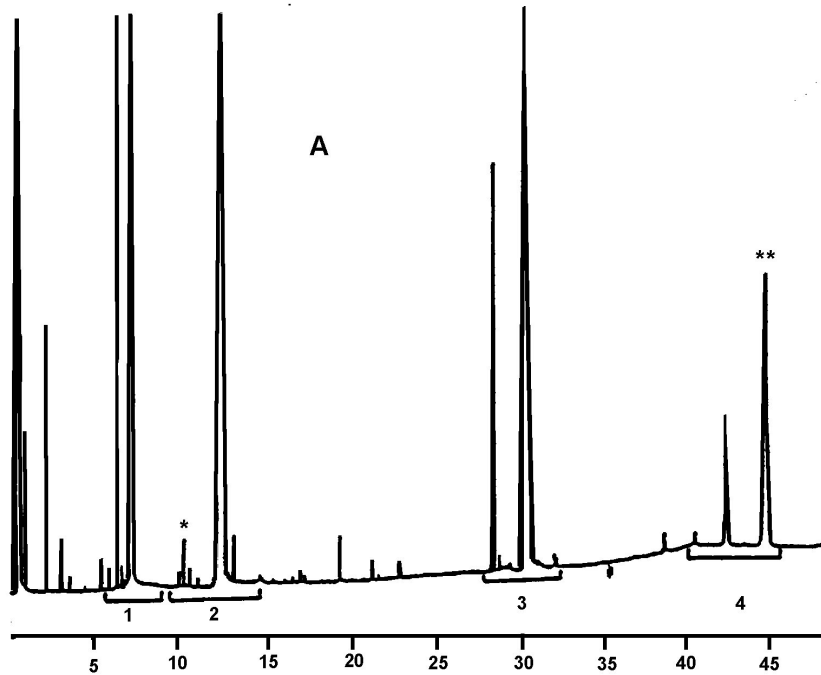
Умовні позначення: «acides gras libres» = вільні жирні кислоти, «Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée» = рафінована оливкова олія + 20 % естерифікованої олії; «1-2 monopalmitoléine» = 1-2 монопальмітолеїн; «1-2 mono C₁₈ insat.» = ненасичений 1-2 моно C₁₈

Рисунок 2

Хроматограма:

(А) неестерифікована оливкова олія, після ліпази; після силанізації; за таких умов (капілярна колонка 8-12 м) фракція воску елюється одночасно з фракцією дигліцериду або трошки пізніше.

Після ліпази вміст тригліцериду не має перевищувати 15%



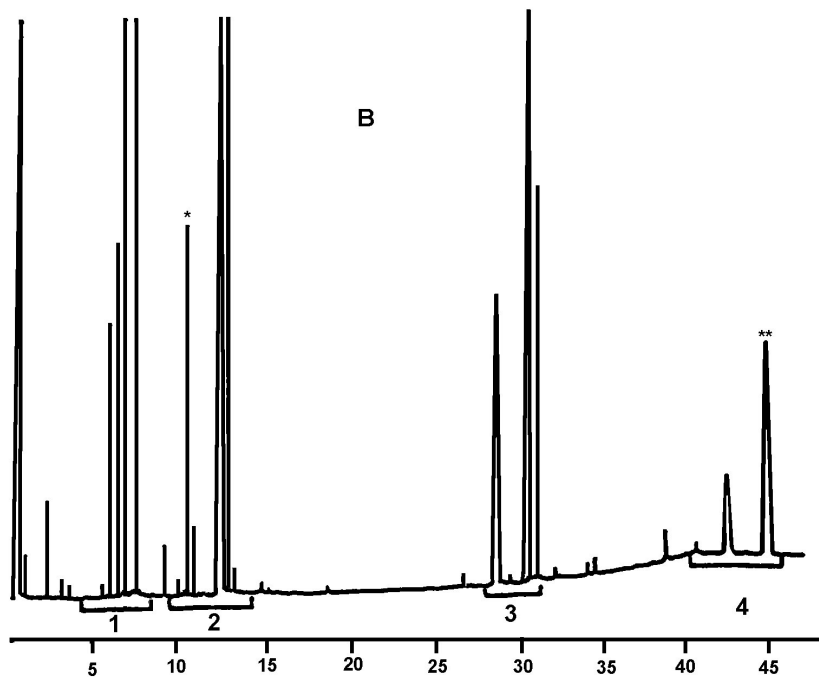
Умовні позначення:

- 1 = Вільні жирні кислоти
- 2 = Моногліцериди
- 3 = Дигліцериди
- 4 = Тригліцериди
- * = 2-монопальмітин
- ** = Тригліцерид C₅₄

Хроматограма:

(В) неестерифікована олія, після ліпази; після силанізації; за таких умов (капілярна колонка 8-12 м) фракція воску елюється одночасно з фракцією дигліцериду або дещо пізніше.

Після ліпази, вміст тригліцериду не має перевищувати 15%.



Умовні позначення:

- | | | |
|----|---|-----------------------------|
| 1 | = | Вільні жирні кислоти |
| 2 | = | Моногліцериди |
| 3 | = | Дигліцериди |
| 4 | = | Тригліцериди |
| * | = | 2-монопальмітин |
| ** | = | Тригліцерид C ₅₄ |

8. ПРИМІТКИ

ПІДГОТУВАННЯ ЛІПАЗИ

Ліпази із задовільною активністю доступні у продажу. Їх також можна приготувати в лабораторних умовах таким чином:

Охолодити до 0 °С 5 кг свіжої свинячої підшлункової залози. Видалити твердий жир, що її оточує, та з'єднувальну тканину і перемолоти у рідку пасту блендером. Змішувати пасту з 2,5 літрами безводного ацетону впродовж 4-6 годин, потім центрифугувати. Екстрагувати залишок ще три рази з тим же об'ємом безводного ацетону, потім двічі з сумішшю ацетону/діетилового ефіру (1/1 об/об) і двічі з діетиловим ефіром.

Залишок сушити у вакуумі впродовж 48 годин, щоб отримати стійкий порошок, який довгий час можна зберігати у холодильнику подалі від вологи.

МОНІТОРИНГ АКТИВНОСТІ ЛІПАЗИ

Приготувати емульсію оливкової олії таким чином:

Упродовж 10 хвилин змішувати у міксері 165 мл розчину гуміарабіку 100 г/л, 15 г колотого льоду та 20 мл попередньо нейтралізованої оливкової олії.

Налити 10 мл емульсії в мензурку 50 мл, потім 0,3 мл розчину холату натрію 0,2 г/мл та потім —20 мл дистильованої води.

Помістити мензурку в термостат, встановлений на 37 °С; ввести електроди рН-метра та шнековий змішувач.

Використовуючи бюретку, по краплі додавати розчин гідроксиду натрію 0,1 N, доки рівень рН не досягне 8,3.

Додати аліквоту порошкової суспензії ліпази у воді (0,1 г/мл ліпази). Як тільки рН-метр показуватиме рівень 8,3, запустити хронометр і по краплі додавати розчин гідроксиду натрію з періодичністю, необхідною для підтримання рН на рівні 8,3. Кожну хвилину фіксувати об'єм спожитого розчину.

Записати дані на системі координат, вказуючи час на осі x, а на осі y — мілілітри розчину акаліну 0,1 N , спожитого для підтримання сталого рівня рН. В результаті буде отриманий лінійний графік.

Активність ліпази, виражену в одиницях ліпази на мг, вказують за такою формулою:

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

де:

A активність в одиницях ліпази/мг

V кількість мілілітрів розчину гідроксиду натрію 0,1 N на хвилину (розрахована на основі графіка).

N титр розчину гідроксиду натрію

m маса тестової ліпази, в мг

Одиницю ліпази визначають як кількість ензиму, що вивільняє 10 мікроеквівалентів кислоти на хвилину.

▼ M20 _____

▼ M28

ДОДАТОК IX

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ В УЛЬТРАФІОЛЕТОВОМУ ВИПРОМІНЮВАННІ

ПЕРЕДМОВА

Спектрофотометричний аналіз в ультрафіолетовому випромінюванні може надати інформацію щодо якості жиру, стану його збереження та змін, викликаних технологічними процесами. Поглинання при довжині хвиль, зазначеній в методі, спричинене наявністю пов'язаних дієнових і трієнових систем, що виникають в результаті процесів окислення і/або способів рафінування. Це поглинання виражають як питому екстинкцію

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$$

(екстинкцію 1% в/о розчину жиру в певному розчиннику, в кюветці об'ємом 10 мм) прийнято позначати як K (також відомий як «коефіцієнт екстинкції»).

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

В цьому додатку описана процедура здійснення спектрофотометричного аналізу оливкової олії в ультрафіолетовому діапазоні.

2. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Зразок розчиняють у необхідному розчиннику та заміряють рівень поглинання розчину на конкретних довжинах хвиль відносно чистого розчинника.

Питому екстинкцію при 232 нм і 268 нм в ізооктані або 232 нм і 270 нм в циклогексані розраховують для концентрації 1% м/об у 10-міліметровій кюветці.

3. ОБЛАДНАННЯ

3.1. Спектрофотометр, що підходить для вимірювання довжини ультрафіолетових хвиль (220 нм-360 нм), з можливістю зчитування окремих нанометричних одиниць. Рекомендується регулярна перевірка точності і відтворюваності шкал поглинання і довжини хвилі, а також розсіяного світла.

3.1.1. *Шкала довжини хвиль:* Її можна перевірити, використовуючи референтний матеріал, який складається зі скляного оптичного фільтру, що містить оксид гольмію або розчин оксиду гольмію

(запечатаний або ні), що має виражені смуги поглинання. Референтні матеріали призначені для верифікації і калібрування шкали довжини хвиль видимих і ультрафіолетових спектрофотометрів з номінальною спектральною пропускнуою здатністю 5 нм або менше. Вимірювання проводять у порівнянні з пустою кюветкою в діапазоні довжини хвиль від 640 до 240 нм відповідно до інструкцій, що додаються до референтних матеріалів. Коригування базової лінії проводять з пустим пучком променю при кожній зміні ширини щілини. Довжина хвиль стандарту вказана у сертифікаті референтного матеріалу.

3.1.2. *Шкала поглинання:* Її можна перевірити, використовуючи доступні у продажу запечатані референтні матеріали, що складаються з кислотних розчинів дихромату калію в певних концентраціях та сертифікованих значень поглинання при λ_{max} (з 4 розчинів дихромату калію в перхлоратній кислоті, запечатаній в чотирьох УФ-кварцових кюветках, для вимірювання лінійності і фотометричної точності в УФ). Розчини дихромату калію вимірюють у порівнянні з використовуваною кислотою після коригування базової лінії відповідно до інструкцій, що додаються до референтного матеріалу. Значення поглинання вказані у сертифікаті референтного матеріалу.

Інша можливість перевірити реакцію фотоелемента та фотоелектронного помножувача полягає в наступному: зважити 0,2000 г чистого хромату калію для спектрофотометрії та розчинити у 0,05 N розчині гідроксиду калію в градуйованій колбі на 1 000 мл та довести до позначки. Взяти точно 25 мл отриманого розчину, перемістити до градуйованої колби об'ємом 500 мл і розбавити до позначки, використовуючи такий же розчин гідроксиду калію.

Виміряти екстинкцію отриманого розчину при 275 нм, використовуючи розчин гідроксиду калію як референтне значення. Екстинкція, виміряна за допомогою кюветки 1 см, повинна бути в межах $0,200 \pm 0,005$.

- 3.2. Прямокутні кварцові кювети, з кришками, придатні для вимірювання на ультрафіолетових довжинах хвиль (220-360 нм) з оптичною довжиною шляху 10 мм. При наповненні водою або іншим підходящим розчинником, різниця між кюветами не повинна становити більше 0,01 одиниць екстинкції.
- 3.3. Мірні колби з однією позначкою, ємністю 25 мл, класу А.
- 3.4. Аналітичні ваги, з точністю вимірювання до 0,0001 г

4. РЕАГЕНТИ

Під час аналізу, якщо не передбачено інше, використовують лише реагенти визнаного аналітичного рівня та дистильовану чи демінералізовану воду, або воду аналогічної чистоти.

Розчинник: Ізо-октан (2,2,4 триметилпентан) для вимірювання при 232 нм та 268 нм та циклогексан для вимірювання при 232 нм та 270 нм, рівень поглинання якого менший 0,12 при 232 нм, та менший 0,05 при 270 нм відносно дистильованої води, виміряний в кюветці 10 мм.

5. ПРОЦЕДУРА

- 5.1. Зразок має бути повністю однорідним без жодних суспендованих забруднювачів. Якщо це не так, необхідно відфільтрувати його через папір при температурі близько 30 °С.
- 5.2. Акуратно зважити близько 0,25 г (з точністю до 1 мг) приготованого таким чином зразка в градуйованій колбі об'ємом 25 мл, розбавити до позначки відповідним розчинником та зробити однорідним. Отриманий розчин має бути повністю прозорим. Якщо спостерігається опалесценція або каламутність, швидко відфільтрувати через папір.

ПРИМІТКА: Загалом маси 0,25-0,30 г достатньо для вимірювання поглинання оливкової олії холодного пресування першого віджиму та оливкової олії холодного пресування першого віджиму екстра класу при 268 нм та 270 нм. Для вимірювання при 232 нм зазвичай необхідно 0,05 г зразка, тому зазвичай готують два окремі розчини. Для вимірювання рівня поглинання оливкових олій з вичавок, рафінованих оливкових олій та оливкових олій з домішками, зазвичай достатньо меншої порції зразка, напр. 0,1 г, через вищий рівень поглинання.

- 5.3. За необхідності відкоригувати базову лінію (220-290 нм) розчинником в обох кварцових кюветках (зразок

та референтний матеріал), потім наповнити кварцову кюветку випробовуваним розчином та виміряти екстинкцію при 232, 268 або 270 нм, відносно розчинника, використовуваного як референтний матеріал.

Зареєстровані значення екстинкції повинні становити від 0,1 до 0,8 або знаходитись в межах лінійності спектрофотометра, яку необхідно перевірити. В іншому разі вимірювання необхідно повторити з використанням більш концентрованих або більш розбавлених розчинів відповідно.

- 5.4. Після вимірювання поглинання при 268 або 270 нм, виміряти поглинання при λ_{max} , $\lambda_{\text{max}} + 4$ та $\lambda_{\text{max}} - 4$. Ці значення поглинання використовують для визначення коливання питомої екстинкції (ΔK).

ПРИМІТКА: λ_{max} вважається рівним 268 нм для ізооктану, використовуваного як розчинник, та 270 нм — для циклогексану.

6. ВИРАЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

- 6.1. Записати питомі значення екстинкції (коефіцієнти екстинкції) на різних довжинах хвиль, розраховані таким чином:

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

де:

$K\lambda$ = питома екстинкція при довжині хвиль λ ;

$E\lambda$ = екстинкція, виміряна при довжині хвиль λ ;

c = концентрація розчину в г/100 мл;

s = довжина оптичного шляху кварцової кювети, в см;

виражені з точністю до двох знаків після коми.

- 6.2. Коливання питомої екстинкції (ΔK)

Коливання абсолютного значення екстинкції (ΔK) подають таким чином:

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

де K_m є питомою екстинкцією для максимального поглинання при 270 нм та 268 нм, залежно від використовуваного розчинника.

Результати виражають з точністю до двох знаків після коми.

ДОДАТОК X

ВИЗНАЧЕННЯ МЕТИЛОВИХ ЕФІРІВ ЖИРНИХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

У цьому додатку представлені настанови щодо визначення методом газової хроматографії вільних та зв'язаних жирних кислот у рослинних жирах та оліях після їх перетворення в метилові ефіри жирних кислот (МЕЖК).

Зв'язані жирні кислоти триацилгліцеролів (ТАГ) та, в залежності від методу естерифікації, вільні жирні кислоти (ВЖК) перетворюються в метилові ефіри жирних кислот (МЕЖК), які визначають методом капілярної газової хроматографії.

Метод, описаний в цьому додатку, дозволяє визначити МЕЖК від C_{12} до C_{24} , включаючи насичені, цис- та трансмононенасичені і цис- та транс-поліненасичені метилові ефіри жирних кислот.

2. ПРИНЦИП

Газову хроматографію (ГХ) використовують для кількісного аналізу МЕЖК. МЕЖК готують відповідно до частини А. Потім їх вводять і випаровують всередині інжектора. Розділення МЕЖК здійснюють на аналітичних колонках спеціальної полярності та довжини. Для виявлення МЕЖК використовують полум'яно-іонізаційний детектор (ПІД). Умови аналізу представлені в частині В.

Водень або гелій можна використовувати як газ-носії (рухома фаза) в газовій хроматографії МЕЖК з використанням ПІД. Водень пришвидшує розділення і дозволяє отримати чіткіші піки. Нерухома фаза – це мікроскопічний шар тонкої плівки рідини на інертній твердій поверхні, утвореній з плавленого кварцу.

Проходячи через капілярну колонку, леткі речовини, що аналізуються, взаємодіють з покриттям нерухомої фази на внутрішній поверхні колонки. Через різну взаємодію різних складових вони елюються в різний час, це називають часом утримання сполуки для заданого набору параметрів аналізу. Порівняння часу утримання використовують для ідентифікації різних сполук.

ЧАСТИНА А

ПРИГОТУВАННЯ МЕТИЛОВИХ ЕФІРІВ ЖИРНИХ КИСЛОТ З ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ ТА ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ З ВИЧАВОК

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

У цій частині зазначено приготування метилових ефірів жирних кислот. Вона включає в себе методи приготування метилових ефірів жирних кислот з оливкової олії та оливкової олії з вичавок.

2. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Приготування метилових ефірів жирних кислот з оливкових олій та оливкових олій з вичавок здійснюють шляхом трансестерифікації з використанням метанольного розчину гідроксиду калію за кімнатної температури. Необхідність очищення зразка перед трансестерифікацією залежить від вмісту вільних жирних кислот у зразку та аналітичного параметра, який необхідно визначити; його можна обирати відповідно до наведеної нижче таблиці:

Категорія олії	Метод
Оливкова олія холодного пресування першого віджиму з кислотністю \leq 2,0%	1. Жирні кислоти 2. <i>транс</i> жирні кислоти 3. ΔECN42 (після очищення силікагелем SPE)
Рафінована оливкова олія	
Оливкова олія, що складається з рафінованої оливкової олії та оливкової олії холодного пресування першого віджиму	
Рафінована оливкова олія з вичавок	
Оливкова олія з вичавок	
Оливкова олія холодного пресування першого віджиму з кислотністю $>$ 2,0%	1. Жирні кислоти (після очищення силікагелем SPE) 2. <i>транс</i> жирні кислоти (після очищення силікагелем SPE) 3. ΔECN42 (після очищення силікагелем SPE)

3. МЕТОДОЛОГІЯ

3.1. Трансетерифікація з використанням метанольного розчину гідроксиду калію за кімнатної температури

3.1.1. *Принцип*

Метиллові ефіри утворюються шляхом трансетерифікації метанольним гідроксидом калію як проміжної стадії перед тим, як відбувається омилення.

3.1.2. *Реагенти*

3.1.2.1. Метанол із вмістом води не більше 0,5% (м/м).

3.1.2.2. Гексан для хроматографії.

3.1.2.3. Гептан для хроматографії.

3.1.2.4. Діетиловий ефір, стабілізований для аналізу.

3.1.2.5. Ацетон для хроматографії.

3.1.2.6. Розчинник для елюювання для очищення олії хроматографією через колонку/SPE, суміш гексану/діетилового ефіру 87/13 (об/об).

3.1.2.7. Гідроксид калію, метанольний розчин близько 2М: розчиняють 11,2 г гідроксиду калію в 100 мл метанолу.

3.1.2.8. Картриджі з силікагелем, 1 г (6 мл), для екстрагування твердої фази.

3.1.3. *Прилади та обладнання*

3.1.3.1. Випробувальні пробірки (об'єм 5 мл) з нарізною пробкою, обладнаною з'єднанням з ПТФЕ.

3.1.3.2. Градуйовані або автоматичні піпетки об'ємом 2 мл та 0,2 мл.

3.1.4. *Очищення зразків олії*

За необхідності зразки очищують, пропускаючи олію через картридж із силікагелем для екстрагування в твердій фазі. Картридж силікагелю (3.1.2.8) поміщають у вакуумний апарат для елюювання та промивають 6 мл гексану (3.1.2.2); промивання здійснюють без вакууму. Потім розчин олії (близько 0,12 г) в 0,5 мл гексану (3.1.2.2) завантажують на колонку. Розчин пропускають через колонку, а потім елюють 10 мл гексану/діетилового ефіру (87:13 об/об) (3.1.2.6). Комбіновані елюати гомогенізують та розділяють на дві частини однакового об'єму. Одну з аліквот випаровують до сухого стану в ротаційному випарнику при зниженому тиску за кімнатної температури. Залишок розчиняють в 1 мл гептану — розчин готовий до аналізу жирних кислот методом ГХ. Другу аліквоту випаровують, а залишок за необхідності розчиняють в 1 мл ацетону для аналізу тригліцеридів методом ВЕРХ.

3.1.5. *Процедура*

В пробірці з нагвинчувальним ковпачком об'ємом 5 мл (3.1.3.1) зважують приблизно 0,1 г зразка олії. Додають 2 мл гептану (3.1.2.2) та збовтують. Додають 0,2 мл метанольного розчину гідроксиду калію (3.1.2.7), закривають кришку, обладнану з'єднанням з ПТФЕ, закручують кришку, енергійно струшують протягом 30 с. Залишають нашаровуватися, поки верхній розчин не стане прозорим. Зціджують верхній шар, що містить метиллові ефіри. Розчин гептану готовий до введення в газовий хроматограф. Рекомендовано зберігати розчин у холодильнику до проведення газового хроматографічного аналізу. Не рекомендовано зберігати розчин більше ніж 12 годин.

ЧАСТИНА В

АНАЛІЗ МЕТИЛОВИХ ЕФІРІВ ЖИРНИХ КИСЛОТ ГАЗОВОЮ ХРОМАТОГРАФІЄЮ

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

У цій частині представлені загальні настанови для застосування газової хроматографії з використанням капілярної колонки для визначення якісного та кількісного складу суміші метилових ефірів жирних кислот, отриманих відповідно до методу, представленого в частині А.

Цю частину не застосовують до полімеризованих жирних кислот.

2. РЕАГЕНТИ

2.1. Газ-носії

Інертний газ (гелій або водень), добре висушений, із вмістом кисню менше 10 мг/кг.

Примітка 1: Водень може вдвічі прискорити швидкість аналізу, але він є небезпечним. Доступні захисні пристрої.

2.2. Допоміжні гази

2.2.1. Водень (чистота $\geq 99,9\%$), без органічних забруднювачів.

2.2.2. Повітря або кисень, без органічних забруднювачів.

2.2.3. Азот (чистота $\geq 99,9\%$).

2.3. Референтний стандарт

Суміш метилових ефірів чистих жирних кислот або метилових ефірів жиру, склад якого відомий, бажано схожий на склад жирової речовини, що аналізується. Цис- та транс-ізомери октадеценних, октадекадієнових та октадекатрієнових метилових ефірів корисні для ідентифікації трансізомерів ненасичених кислот.

Необхідно подбати про попередження окиснення поліненасичених жирних кислот.

3. ПРИЛАДИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Наведені інструкції стосуються звичайного обладнання, використовуваного для газової хроматографії з використанням капілярних колонок та детектора іонізації полум'я.

3.1. Газовий хроматограф

Газовий хроматограф має складатись із таких елементів.

3.1.1. Система введення

Використовують систему введення з капілярними колонками, у цьому випадку система введення має бути спеціально розроблена для її використання з такими колонками. Це може бути роздільна система введення або система введення без розділення в колонці.

3.1.2. Піч

Піч має бути здатна розігрівати капілярну колонку до температури щонайменше 260 °C та підтримувати бажану температуру з точністю до 0,1 °C. Остання вимога є особливо важливою при використанні пробірки з плавленого кварцу.

В усіх випадках рекомендовано використовувати підігрів з можливістю програмування температури, зокрема для жирних кислот, кількість атомів вуглецю в яких становить менше 16.

3.1.3. Капілярна колонка

3.1.3.1. Пробірка, виготовлена з матеріалу, інертного до речовин, які підлягають аналізу (зазвичай скло або плавлений кварц). Внутрішній діаметр повинен становити 0,20-0,32 мм. Внутрішня поверхня має пройти відповідну обробку (напр. підготовку поверхні, інактивацію) перед нанесенням шару нерухомої фази. Довжини 60 м достатньо для жирних кислот та цис- і транс-ізомерів жирних кислот.

3.1.3.2. Нерухома фаза, підходять з'єднані (перехресно з'єднані) колонки з полярних полісилоксанів (ціанопропілсилікон).

Примітка 2: Існує ризик того, що полярні полісилоксани можуть збільшити вірогідність ускладнень при ідентифікації та розділенні ліноленової кислоти та кислот C₂₀.

Покриття має бути тонким, тобто 0,1-0,2 мкм.

3.1.3.3. Збирання та приведення колонки у робочий стан

Дотримуйтеся звичайних запобіжних заходів при збиранні капілярних колонок, таких як встановлення колонки в печі (опора), вибір та збирання з'єднань (герметичність), розміщення кінців колонки в інжекторі та детекторі (зменшення мертвого простору). Помістіть колонку під струмінь газу-носія (напр. 0,3 бар (30 кПа) для колонки довжиною 25 м та внутрішнім діаметром 0,3 мм).

Приведіть колонку в робочий стан шляхом програмування температури печі при 3 °С/хв від температури навколишнього середовища до температури на 10 °С нижчої від граничного значення розпаду нерухомої фази. Підтримуйте піч за такої температури впродовж однієї години, доки базова лінія не стабілізується. Поверніть температуру до 180 °С для роботи в ізотермічних умовах.

Примітка 3: Належним чином попередньо підготовані колонки доступні в продажу.

3.1.4. Полум'яно-іонізаційний детектор та перетворювач-підсилювач

3.2. Шприц

Максимальна ємність шприца має становити 10 мкл, з кроком градування 0,1 мкл.

3.3. Система збору даних

Система збору даних з'єднана в режимі он-лайн з детекторами; її використовують з програмним забезпеченням для інтеграції та нормалізації піку.

4. ПРОЦЕДУРА

Операції, описані в пунктах 4.1-4.3, стосуються використання детектора іонізації полум'я.

4.1. Умови випробування

4.1.1. Вибір оптимальних робочих умов для капілярних колонок

Завдяки ефективності та проникності капілярних колонок, розділення складових частин та тривалість аналізу значною мірою залежать від швидкості потоку газу-носія в колонці. Тому необхідно оптимізувати робочі умови, відрегулювавши цей параметр (або просто зменшивши тиск у верхній частині колонки) в залежності від того, чи мається на меті поліпшення розділення чи прискорення аналізу.

Було виявлено, що такі умови підходять для розділення МЕЖК (C₄-C₂₆). Приклади хроматограм наведені у доповненні В:

Температура інжектора:	250 °С
Температура детектора:	250 °С
Температура печі:	від 165 °С (8 хв) до 210 °С при 2 °С/хв
Газ-носії водень:	тиск на верхню частину колонки, 179 кПа
Загальний потік:	154,0 мл/хв;
Коефіцієнт розділення:	1:100
Об'єм введення:	1 мкл

4.1.2. Визначення роздільної здатності (див. доповнення А)

Розрахувати роздільну здатність R двох сусідніх піків I та II, використовуючи формулу:

$$R = 2 \times ((d_{dr(II)} - d_{r(I)}) / (\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ або } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (Фармакопея США),}$$

або

$R = 1,18 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)}))$ (EP, BP, JP, DAB), (JP (Японська фармакопея), EP (Європейська фармакопея), BP (Британська фармакопея))

де:

$d_{r(I)}$ це відстань утримання піку I;

$d_{r(II)}$ це відстань утримання піку II;

$t_{r(I)}$ це час утримання піку I;

$t_{r(II)}$ це час утримання піку II;

$\omega_{(I)}$ це ширина основи піку I;

$\omega_{(II)}$ це ширина основи піку II;

$\omega_{0,5}$ це ширина піку певного складника, на середині висоти піку;

Якщо $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, розрахувати R використовуючи такі формули:

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

де:

σ це стандартне відхилення (див. доповнення А, рисунок 1).

Якщо відстань d_r між двома піками $d_{r(II)} - d_{r(I)}$ дорівнює 4σ , коефіцієнт роздільної здатності $R = 1$.

Якщо два піки не повністю відокремлені, дотичні до точок перетину двох піків перетинаються в точці С. Щоб повністю відокремити два піки, відстань між двома піками має дорівнювати:

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma \text{ звідки } R = 1,5 \text{ (див. доповнення А, рисунок 3).}$$

5. ВИРАЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

5.1. Якісний аналіз

Визначити піки метилового ефіру зразка з хроматограми в доповненні В, рисунок 1, якщо необхідно, шляхом інтерполяції або порівняння з референтними сумішами метилових ефірів (як зазначено в пункті 2.3).

5.2. Кількісний аналіз

5.2.1. Визначення складу

Розрахувати масову частку w_i окремих метилових ефірів жирних кислот, виражену як масову частку метилових ефірів таким чином:

5.2.2. Метод розрахунку

5.2.2.1. Загальний випадок

Обчислити вміст даного компонента i , вираженого як масову частку метилових ефірів, шляхом визначення відсотка, представленого площею відповідного піку відносно суми площ усіх піків, використовуючи таку формулу:

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

де:

A_i – площа під піком окремих метилових ефірів жирних кислот i ;

ΣA – сума площ під усіма піками усіх окремих метилових ефірів жирних кислот;

Результати відображають з точністю до двох знаків після коми.

Примітка 4: Для жирів та олій масова частка метилових ефірів жирних кислот дорівнює масовій частці триацилгліцеролів в грамах на 100 г. Для випадків, коли таке припущення не дозволяється, див. 5.2.2.2.

5.2.2.2. Застосування коригуючих коефіцієнтів

В деяких випадках, наприклад при наявності жирних кислот з менш ніж вісьмома атомами вуглецю, або кислот з вторинними групами, площі необхідно відкоригувати, враховуючи спеціальні коригуючі коефіцієнти (F_{ci}). Такі коефіцієнти необхідно визначити для кожного окремого інструмента. Для цього використовують відповідні референтні матеріали з сертифікованим складом жирних кислот у відповідному діапазоні.

Примітка 5: Ці коригуючі коефіцієнти не ідентичні теоретичним коригуючим коефіцієнтам ПД, які наведені у доповненні А, оскільки вони також включають ефективність системи введення тощо. Однак, у випадку більших розбіжностей, всю систему слід перевірити на ефективність.

Для такої референтної суміші відсоток маси МЕЖК i визначається за формулою:

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

де

m_i це маса МЕЖК i в референтній суміші;

Σm це сукупність мас різних компонентів, виражена як МЕЖК суміші для порівняння.

Виходячи з хроматограми референтної суміші, обчислюють відсоток за площею для МЕЖК i таким чином:

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

де:

A_i – це площа МЕЖК i в референтній суміші;

ΣA – це сума усіх площ усіх МЕЖК референтної суміші.

Тоді коригувальний коефіцієнт F_c є таким

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

Для зразка, часова частка кожного МЕЖК це i :

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

Результати відображають з точністю до двох знаків після коми.

Примітка 6: Розраховане значення відповідає відсотку маси окремої жирної кислоти, розрахованої як триацилгліцероли на 100 г жиру.

5.2.2.3. Використання внутрішнього стандарту

У деяких аналізах (наприклад, коли не всі жирні кислоти можна вирахувати, як от коли кислоти з чотирма та шістьма атомами вуглецю присутні поряд з кислотами з 16 та 18 атомами вуглецю, або коли необхідно визначити абсолютну кількість жирної кислоти в зразку), необхідно використовувати внутрішній стандарт. Часто використовують жирні кислоти з 5, 15 або 17 атомами вуглецю. Необхідно визначити коригувальний коефіцієнт (якщо такий є) для внутрішнього стандарту.

Тоді масова частка компонента i , виражена як метилові ефіри, подається за такою формулою:

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

де:

A_i це площа МЕЖК i ;

A_{IS} це площа внутрішнього стандарту;

F_i коригувальний коефіцієнт жирної кислоти i , виражений як МЕЖК;

F_{IS} це коригувальний коефіцієнт внутрішнього стандарту;

m це маса відібраної проби, в міліграмах

m_{IS} це маса внутрішнього стандарту, в міліграмах.

Результати відображають з точністю до двох знаків після коми.

6. ПРОТОКОЛ ВИПРОБУВАННЯ

У протоколі випробування зазначають методи, використані для підготування метилових ефірів і для газового хроматографічного аналізу. У ньому також вказуються всі технічні деталі, які не вказані у цьому стандартному методі, або що вважаються необов'язковими, а також відомості про будь-які інциденти, які могли вплинути на результати.

Протокол випробування має включати всю інформацію, необхідну для повної ідентифікації зразка.

7. ТОЧНІСТЬ

7.1. Результати міжлабораторного випробування

Деталі міжлабораторного випробування щодо точності методу визначені в додатку С до стандарту ІОС/Т.20/Дос. № 33. Значення, отримані в результаті цього міжлабораторного випробування, не можна застосовувати для діапазонів концентрації і матриць, відмінних від тих, що надаються.

7.2. Повторюваність

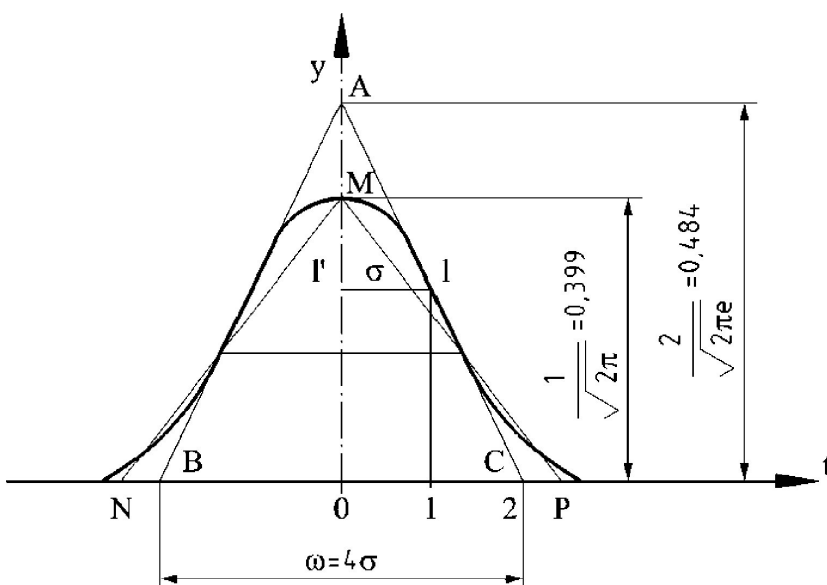
Абсолютна різниця між двома незалежними окремими результатами випробувань, отриманими з використанням одного і того ж методу на ідентичному тестовому матеріалі в тій самій лабораторії одним і тим самим оператором з використанням одного і того ж обладнання протягом короткого проміжку часу, буде не більше ніж у 5% випадків перевищувати значення r , наведені в таблицях 1-14 в додатку С до стандарту ІОС/Т.20/Дос. № 33.

7.3. Відтворюваність

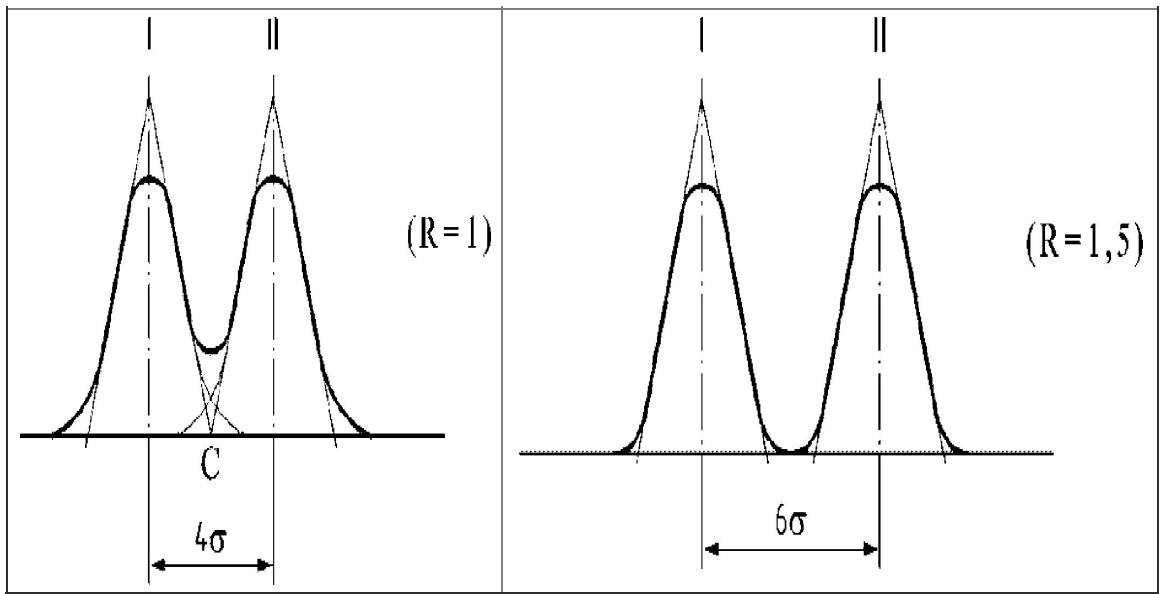
Абсолютна різниця між двома окремими результатами тестів, отриманими з використанням одного і того ж методу на ідентичному тестовому матеріалі в різних лабораторіях та при використанні різними операторами різного обладнання, буде не більше ніж у 5% випадків перевищувати значення R , наведене в таблицях 1-14 у додатку С до стандарту ІОС/Т.20/Дос. № 33.

Доповнення А

Рисунок 1



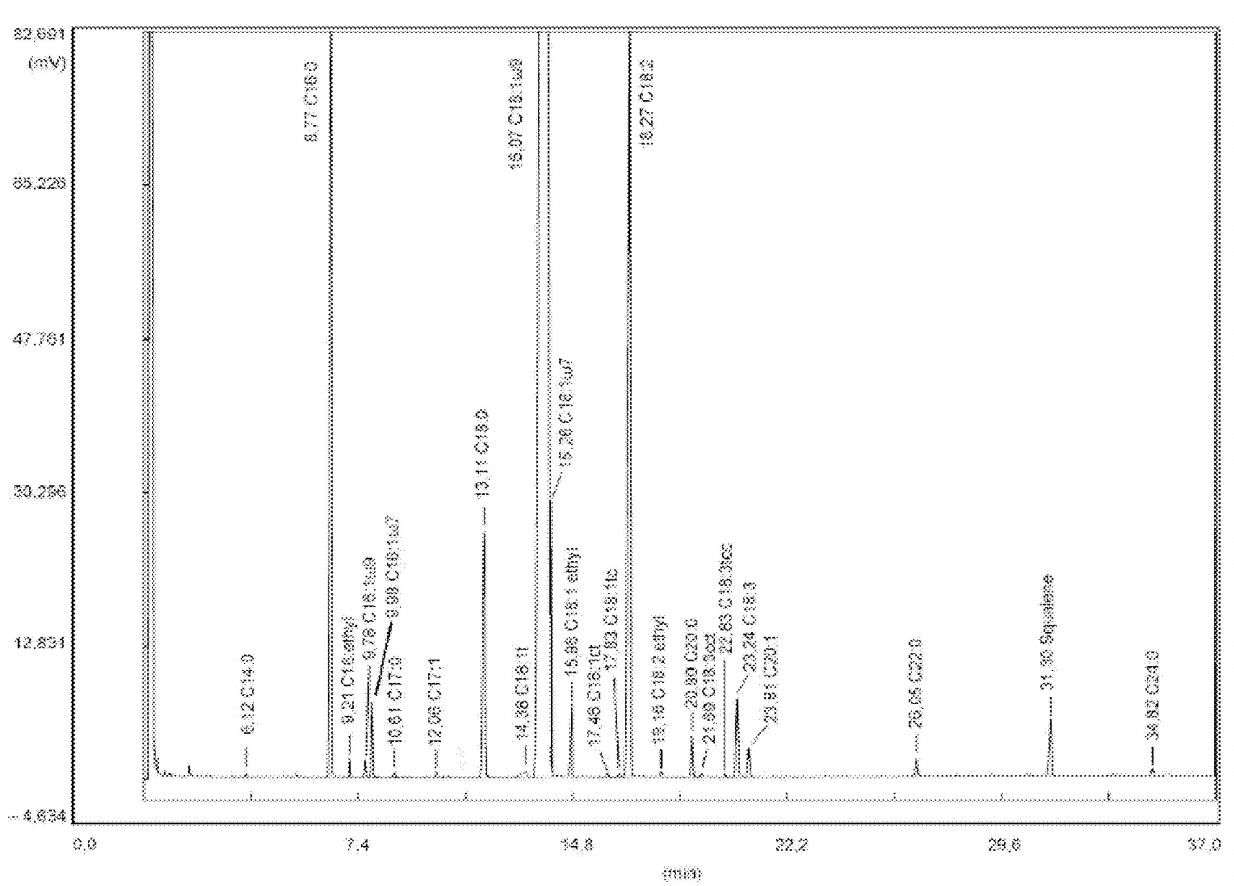
$\omega_{0,5}$ ширина на половині висоти трикутника (ABC) і ширина b на половині висоти трикутника (NPM).



Доповнення В

Рисунок 1

Газохроматографічний профіль, отриманий методом холодного метилювання з оливкової олії з вичавок



Хроматографічні піки відповідають метиловим та етиловим ефірам, крім випадків, коли зазначено інше.

▼В

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЛЕТКИХ ГАЛОГЕНОВАНИХ РОЗЧИННИКІВ ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ

1. МЕТОД

Аналіз шляхом газової хроматографії, використовуючи технологію визначення складу летких речовин у вільному просторі над рідиною.

2. ОБЛАДНАННЯ

- 2.1. Апарат для газової хроматографії, обладнаний детектором захопленням електронів (ДЗЕ).
- 2.2. Апаратура для визначення складу летких речовин у вільному просторі над рідиною.
- 2.3. Скляна хроматографічна колонка довжиною 2 м і діаметром 2 мм, нерухома фаза. OV101 10 % або еквівалент, який просочує кальциновану діатомову землю, промиту кислотою і силанізовану з розміром частинок від 80 до 100 меш.
- 2.4. Газ-носії та допоміжний газ: азот для газової хроматографії, що підходить для виявлення шляхом захоплення електронів.
- 2.5. Скляна колба 10-15 мл, з тефлоновим покриттям та алюмінієвою пробкою, з елементом для введення шприца.
- 2.6. Затискачі для герметичного запакування.
- 2.7. Газовий шприц об'ємом 0,5 – 2 мл.

3. РЕАГЕНТИ

Стандарт: галогеновані розчинники ступеня чистоти, що підходить для газової хроматографії.

4. ПРОЦЕДУРА

- 4.1. Точно зважити приблизно 3 г олії в скляній колбі (не використовувати повторно); герметично закрити її. Помістити її в термостат при 70 °С на одну годину. Використовуючи шприц, обережно видалити 0,2–0,5 мл з простору над рідиною. Ввести його до колонки апарату для газової хроматографії, налаштованого так:
 - температура інжектора: 150 °С,
 - температура колонки: 70-80 °С,
 - температура детектора: 200-250 °С.Можна також використовувати інші температури, за умови, що результати лишатимуться еквівалентними.
- 4.2. Референтні розчини: підготувати стандартні розчини, використовуючи рафіновану оливкову олію без слідів розчинників, з концентраціями від 0,05 до 1 ppm (мг/кг), які відповідатимуть очікуваному вмісту зразка. Галогеновані розчинники можна розбавляти, використовуючи пентан.
- 4.3. Кількісне оцінювання: корелювати поверхні або підвищення піків зразка зі стандартним розчином з приблизною передбачуваною концентрацією. Якщо відхилення перевищує 10 %, аналіз необхідно повторити в порівнянні з іншим референтним розчином доти, поки відхилення не буде в межах 10 %. Вміст визначають на основі середнього показника окремих введень.
- 4.4. Вираження результатів: у ppm (мг/кг). Поріг чутливості для цього методу становить 0,01 мг/кг.

▼M26

МЕТОД МІЖНАРОДНОЇ РАДИ З ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ ДЛЯ ОРГАНОЛЕПТИЧНОГО ОЦІНЮВАННЯ ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ ХОЛОДНОГО ПРЕСУВАННЯ ПЕРШОГО ВІДЖИМУ

▼ M28

1. МЕТА ТА СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Метою міжнародного методу, описаного в цьому додатку, є визначення процедури оцінювання органолептичних показників оливкової олії холодного пресування першого віджиму у розумінні пункту 1 частини VIII додатка VII до Регламенту (ЄС) Європейського парламенту і Ради № 1308/2013 (⁴) і встановлення методу її класифікації на основі таких характеристик. Він також надає вказівки щодо необов'язкового маркування.

Описаний метод можна застосовувати тільки до оливкової олії холодного пресування першого віджиму, а також до класифікації або маркування такої олії відповідно до інтенсивності сприймання дефектів і фруктового аромату, що визначені групою дегустаторів, які були обрані, пройшли навчання і моніторяться як експертна група.

Використовують останню версію стандартів Міжнародної ради з оливкової олії, згаданих у цьому додатку.

▼ M26

2. ЗАГАЛЬНИЙ СЛОВНИК ДЛЯ СЕНСОРНОГО АНАЛІЗУ

Див. стандарт ІОС/Т.20/Дос. № 4 «Сенсорний аналіз: Загальний основний словник»

3. СПЕЦІАЛЬНИЙ СЛОВНИК

3.1. Негативні характеристики

Прілий/мутний осад: Характерний смак і запах олії, отриманої з оливок, що їх склали або зберігали в умовах, які призвели до анаеробної ферментації пізньої стадії; або олії, яка була залишена в контакт з осадом, який осідає в підземних резервуарах і чанах, і який також зазнав процесу анаеробного бродіння.

Гнилісно-відсирилий-землистий: Характерний смак і запах олій, отриманих з плодів, в яких утворилася велика кількість плісняви і дріжджів у результаті їх зберігання у вологих умовах протягом декількох днів або олії, отриманої з оливок, які були зібрані з землею або брудом на них і не були промиті.

Винно-оцтово-кислотно-кислий: Характерний смак і запах деяких олій, що нагадує вино чи оцет. Цей смак і запах в основному є результатом процесу аеробного бродіння оливок або оливкової пасти, залишених на неналежним чином очищених матах для пресування, внаслідок чого утворюється оцтова кислота, етилацетат та етанол.

Згірклий: Смак і запах олій, що пройшли інтенсивний процес окиснення.

Підморожені оливки (волога деревина): Характерний смак і запах олії, добутої з оливок, які були пошкоджені морозом на дереві.

▼ M28

3.1.1. Інші негативні характеристики

<i>Підігртий чи підгорілий</i>	Характерний смак і запах олій, викликаний надмірним та/або тривалим нагріванням під час переробки, зокрема під час змішування пасти з термічною обробкою, якщо цей процес виконується за невідповідних теплових умов.
<i>Сінний/деревинний</i>	Характерний присмак деяких олій, виготовлених з висохлих оливок.
<i>Грубий</i>	Густе та в'язке смакове відчуття старих олій.
<i>Масило</i>	Смак і запах олії нагадує дизельне пальне, мастило або мінеральну олію.

<i>Сокова вода</i>	Смак і запах, який отримала олія в результаті тривалого контакту з соковою водою, що піддалася процесам ферментації.
<i>Розсільний</i>	Смак і запах олії, добутої з оливок, що їх зберігали в розсолі.
<i>Металічний</i>	Смак і аромат, що нагадує метали. Характерний для олії, яка знаходилася в тривалому контакті з металевими поверхнями під час подрібнення, змішування, пресування або зберігання.
<i>Еспарто</i>	Характерний смак і запах олії, отриманої з оливок, пресованих на нових матах з еспарто. Смак і запах може відрізнитися в залежності від того, чи мати зроблені з зеленого еспарто, чи з висушеного еспарто.
<i>Червивий</i>	Смак і запах олії, отриманої з оливок, сильно уражених личинками оливкових мух (<i>Bactrocera oleae</i>).
<i>Огірковий</i>	Присмак, що виникає, коли олія герметично запакована занадто довгий час, особливо у бляшаних контейнерах, що пов'язано з утворенням наонадієналу 2,6.

3.2. Позитивні характеристики

<i>Фруктовий</i>	Набір характеристик нюхових відчуттів олій, який залежить від різновиду, а також походить від здорових, свіжих оливок, дозрілих чи недозрілих. Сприймається безпосередньо і/або через задню частину носа.
<i>Гіркий</i>	Характерний первинний смак олії, одержуваної з зелених оливок або достигаючих оливок. Відчувається за допомогою жолобовидних сосочків, у V-подібній зоні язика.
<i>Гострий</i>	Тактильне поколююче відчуття, характерне для олій, вироблених на початку сезону, в основному зі ще недозрілих оливок. Воно відчувається у всій порожнині рота, і особливо в горлі.

▼ M32

3.3. Небов'язкова термінологія для цілей маркування

За запитом керівник експертної групи може засвідчити, що олії, які були оцінені, відповідають визначенням та діапазнам, які відповідають виключно таким умовам відповідно до інтенсивності та сприйняття ознак.

Позитивні характеристики (фруктовий, гіркий і гострий): Відповідно до інтенсивності сприйняття:

- *Сильний*, коли медіана ознаки більше 6,0;
- *Середній*, коли медіана ознаки більше 3,0 та менше або дорівнює 6,0
- *Легкий*, коли медіана ознаки менша ніж 3,0;

<i>Фруктовий аромат</i>	Набір нюхових відчуттів, характерних для олій, який залежить від сорту оливок, а також походить від здорових, свіжих оливок, в яких не переважає присмак ані зелених, ані достиглих плодів. Сприймається безпосередньо і/або через задню частину носа.
<i>Аромат зелених плодів</i>	Набір нюхових відчуттів, характерний для олії, що нагадує зелені плоди, залежить від сорту оливок і походить від зелених, здорових, свіжих оливок. Сприймається безпосередньо і/або через задню частину носа.
<i>Аромат дозрілих плодів</i>	Набір нюхових відчуттів, характерний для олії, що нагадує дозрілі плоди, залежить від сорту оливок і походить від здорових, свіжих оливок. Сприймається безпосередньо і/або через задню частину носа.
<i>Добре збалансований</i>	Олія, яка не виявляє нестачу балансу, під яким мається на увазі нюхові та тактильні відчуття, коли медіана гіркоти і медіана гостроти не перевищує більше ніж на 2,0 пункти медіану фруктового аромату.
<i>М'яка олія</i>	Олія, в якій медіана гіркоти і гостроти дорівнює 2,0 або нижче.

Перелік умов відповідно до інтенсивності сприйняття:

Умови, що підлягають оформленню сертифіката органолептичного випробування	Медіана ознаки
Фруктовий аромат	—
Аромат дозрілих плодів	—
Аромат зелених плодів	—
Аромат дозрілих плодів	$\leq 3,0$
Середній фруктовий аромат	$3,0 < Me \leq 6,0$
Сильний фруктовий аромат	$> 6,0$
Легкий аромат дозрілих плодів	$\leq 3,0$
Середній аромат дозрілих плодів	$3,0 < Me \leq 6,0$
Сильний аромат дозрілих плодів	$> 6,0$
Легкий аромат зелених плодів	$\leq 3,0$
Середній аромат зелених плодів	$3,0 < Me \leq 6,0$

Сильний аромат зелених плодів	> 6,0
Легка гіркота	≤ 3,0
Середня гіркота	3,0 < Me ≤ 6,0
Сильна гіркота	> 6,0
Легка різкість	≤ 3,0
Середня різкість	3,0 < Me ≤ 6,0
Сильна різкість	> 6,0
Добре збалансована олія	Медіана ознаки гіркоти і медіана ознаки гостроти не більше ніж на 2,0 пункти переважають медіану фруктового аромату.
М'яка олія	Медіана ознаки гіркоти і медіана ознаки гостроти дорівнюють 2,0 або менше.

▼ M26

4. СКЛЯНКА ДЛЯ ДЕГУСТАЦІЇ ОЛІЇ

Див. стандарт ІОС/Т.20/Дос. № 5 «Склянка для дегустації олії».

5. ПРИМІЩЕННЯ ДЛЯ ВИПРОБУВАНЬ

Див. стандарт ІОС/Т.20/Дос. № 6, «Керівництво щодо обладнання приміщення для випробувань».

6. ПРИЛАДДЯ

Наступне приладдя, необхідне дегустаторам для належного виконання їхніх завдань, повинно бути забезпечене в кожній кабінці та повинно бути легкодоступним:

- склянки (стандартизовані), що містять зразки, з кодovими номерами, накриті препаратним склом і зберігаються при температурі $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- форма оцінювання (див. рисунок 1) у паперовій або електронній формі, за умови, що вона відповідає вимогам форми оцінювання, за необхідності з інструкціями щодо її використання;
- ручка або незмивне чорнило
- підноси зі шматочками яблука та/або водою, газованою водою та/або сухарями
- склянка води температури навколишнього середовища
- аркуш, що містить загальні правила, перераховані у секціях 8.4 і 9.1.1
- плювальниця.

7. КЕРІВНИК ЕКСПЕРТНОЇ ГРУПИ І ДЕГУСТАТОРИ

7.1. Керівник експертної групи

Керівник експертної групи повинен бути особою з належною підготовкою та експертними знаннями щодо видів олій, з якими він матиме справу в ході роботи. Він є ключовим учасником експертної групи та відповідає за організацію і перебіг дегустації.

Робота керівника експертної групи вимагає базової підготовки щодо інструментів сенсорного аналізу, сенсорних навичок, ретельності при підготовці, організації та проведенні випробування, навичок та терпіння планувати і проводити випробування в науковий спосіб.

Він є єдиною особою, відповідальною за підбір, підготовку та моніторинг дегустаторів з метою встановлення рівня їхньої професійної придатності. Він, таким чином, відповідає за оцінку дегустаторів, яка завжди повинна бути об'єктивною і для якої вони повинні розробити конкретні процедури, які базуються на тестах і ретельних критеріях прийняття і відхилення. Див. стандарт ІОС/Т.20/Дос. № 14 «Посібник з підбору, підготовки та моніторингу компетентних дегустаторів оливкової олії холодного пресування першого віджиму».

Керівник експертної групи несе відповідальність за роботу експертної групи, а отже, і за її оцінку, для якої він повинен надати надійні, об'єктивні докази. У будь-якому випадку він має постійно демонструвати, що метод та дегустатори знаходяться під контролем. Рекомендовано періодично переглядати склад експертної групи (ІОС/Т.20/Doc. No 14, § 5).

Він несе повну відповідальність за ведення записів експертної групи. Ці записи повинні завжди бути простежувані. Вони повинні відповідати вимогам щодо забезпечення та якості, встановленим у міжнародних стандартах сенсорного аналізу, і гарантувати анонімність зразків у будь-який час.

Він несе відповідальність за інвентаризацію та забезпечення належного очищення та обслуговування пристроїв і обладнання, необхідних для дотримання специфікацій цього методу, і зберігати письмові докази цього, а також підтвердження відповідності умовам випробувань.

Він повинен відповідати за приймання і зберігання зразків після їх надходження в лабораторію, а також зберігання їх після випробування. При цьому він повинен завжди забезпечувати, щоб зразки залишалися анонімними і належним чином зберігалися, з цією метою він повинен розробити письмові процедури, щоб гарантувати, що весь процес простежується і забезпечуються гарантії.

Крім того, він несе відповідальність за підготовку, кодування та представлення зразків дегустаторам згідно з відповідним планом експерименту відповідно до попередньо встановлених протоколів, а також за збирання та статистичне оброблення даних, отриманих дегустаторами.

Він також відповідає за розробку та підготовку проектів будь-яких інших процедур, що можуть бути необхідними для дотримання цього стандарту та для забезпечення належної роботи експертної групи.

Він повинен шукати способи порівняння результатів експертної групи з результатами, отриманими іншими експертними групами, що проводять аналіз оливкової олії холодного пресування першого віджиму, щоб упевнитись, що експертна група працює належним чином.

Обов'язок голови експертної групи – мотивувати членів експертної групи, заохочуючи інтерес, допитливість та змагальний дух серед них. Для цього йому настійно рекомендовано забезпечити безперервний двосторонній потік інформації між членами групи, інформуючи їх про всі завдання, які вони виконують, і про отримані результати. Крім цього він забезпечує, щоб його висновок не був відомий, і не дозволяв потенційним лідерам нав'язувати свої критерії іншим дегустаторам.

Він викликає дегустаторів заздалегідь, і відповідає на будь-які запити щодо проходження випробувань, але утримує від висловлення будь-яких висновків щодо зразків.

▼ M28

7.1.1. Заступник керівника експертної групи

Керівника експертної групи можна, за належного обґрунтування, замінити заступником керівника експертної групи, який може виконувати обов'язки щодо проведення випробувань. Цей замісник повинен мати всі навички, необхідні керівнику експертної групи.

▼ M28

7.2. Дегустатори

Люди, які виступають дегустаторами під час органолептичних випробувань, що їх проводять з оливковими оліями, мають виконувати цю роботу добровільно. Тому кандидатам рекомендують подавати письмові заявки. Кандидатів підбирає, готує та контролює керівник експертної групи відповідно до їхніх навичок розрізнення схожих зразків; необхідно мати на увазі, що точність покращиться завдяки підготовці.

Дегустатори мають поводитися як справжні сенсорні спостерігачі, залишаючи осторонь свої особисті смаки та чітко доповідаючи про відчуття, які вони відчувають. Щоб це зробити, вони повинні завжди працювати у тиші, спокійно, неквапливо, приділяючи максимально повну чуттєву увагу зразку, який вони дегустують.

Для кожного випробування потрібно від 8 до 12 дегустаторів, хоча розумно тримати деяких додаткових дегустаторів у резерві для покриття можливої відсутності когось з них.

▼ M26

8. УМОВИ ВИПРОБУВАННЯ

8.1. Представлення зразка

Зразок олії для аналізу представляють в стандартизованих склянках для дегустації, що відповідають стандарту ІОС/Т.20/Дос. № 5 «Склянка для дегустації олії».

Склянка має містити 14-16 мл олії, або 12,8-14,6 г, якщо зразки потрібно зважувати, та має бути накрита предметним склом.

Кожна склянка має бути позначена кодом, що складається з цифр або комбінації літер та цифр, обраних довільно. Код наносять за допомогою системи без запаху.

8.2. Випробування та температура зразка

Зразки олії, призначені для дегустації, слід зберігати у склянках за температури $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ впродовж усього випробування. Цю температуру обрано тому, що при ній простіше виявляти органолептичні відмінності, ніж при температурі навколишнього середовища, і тому що при нижчих температурах ароматичні складові, властиві цим оліям, слабко волатилізуються, в той час як за більш високих температур утворюються леткі складові, характерні нагрітим оліям. Див. стандарт ІОС/Т.20/Дос. № 5 «Склянка для дегустації олії» для методу, який потрібно використовувати для нагрівання зразків, коли вони у склянці.

В приміщенні для випробувань повинна підтримуватися температура 20-25 °С (див. ІОС/Т.20/Дос. № 6).

8.3. Час випробування

Ранок — найкращий час для дегустації олій. Було доведено, що існують оптимальні періоди сприйняття смаку і запаху впродовж дня. Період загострення нюхово-смакової чутливості передуює прийманню їжі, тоді як після нього ця чутливість зменшується.

Однак цей критерій не варто доводити до крайнощів, оскільки голод може відволікати дегустаторів, таким чином знижуючи їхню здатність до розрізнення; тому рекомендовано проводити сеанси дегустації між 10:00 ранку та 12:00 дня.

8.4. Дегустатори: загальні правила поведінки

Ці рекомендації застосовують до поведінки дегустаторів під час їхньої роботи.

Отримавши запрошення керівника експертної групи до участі в органолептичному випробуванні, дегустатори мають бути спроможні прибути в попередньо визначений час та повинні дотримуватись таких правил:

- Вони не повинні палити або пити каву принаймні за 30 хвилин до часу, встановленого для випробування.
- — Вони не повинні використовувати аромат, косметичні засоби або мило, запах яких може триматися до моменту випробування. Вони мають використовувати мило без запаху для миття рук, потім необхідно сполоскувати та сушити руки настільки часто, наскільки необхідно для усунення будь-якого запаху.
- Вони не повинні споживати їжу щонайменше годину до початку випробування.
- — У разі поганого самопочуття, зокрема, якщо це впливає на їх нюх чи смак або через психологічний ефект, який заважає зосередитися на роботі, дегустатори повинні утриматися від дегустації та повідомити про це керівника експертної групи.
- Якщо зазначених вище правил було дотримано, дегустатори впорядковано та спокійно займають місця в призначених їм кабінах.
- Вони уважно читають інструкції, надані на формі оцінювання, та не повинні починати досліджувати зразок, доки не будуть повністю готові до виконання завдання (розслаблено і не поспішаючи). Якщо виникають якісь сумніви, вони повинні проконсультуватися з керівником експертної групи особисто.
- Вони мають зберігати тишу під час виконання завдань.
- — Вони повинні постійно тримати свій мобільний телефон вимкнутим, щоб не заважати концентрації та роботі колег.

9. ПРОЦЕДУРА ОРГАНОЛЕПТИЧНОГО ОЦІНЮВАННЯ ТА КЛАСИФІКАЦІЇ ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ ХОЛОДНОГО ПРЕСУВАННЯ ПЕРШОГО ВІДЖИМУ

9.1. Техніка випробування

▼ M29

9.1.1. Дегустатори підіймають склянку, залишаючи її накритою предметним склом, та легко її нахилиють; потім вони повинні повністю повернути склянку в це положення, щоб якомога більше змочити внутрішню частину. Після завершення цього етапу вони прибирають предметне скло та нюхають зразок, роблячи повільні глибокі вдихи, щоб оцінити олію. Нюхання не повинне тривати більше 30 секунд. Якщо впродовж цього часу не було досягнуто жодного висновку, вони повинні трохи відпочити перед повторною спробою.

Після оцінювання запаху дегустатори оцінюють відчуття у ротовій порожнині (загальні ретроназальні нюхові, смакові та тактильні відчуття). Для цього вони набирають у ротову порожнину близько 3 мл олії. Дуже важливо розподілити олію по всій ротовій порожнині: від передньої частини рота та язика до бокових та задньої частин, піднебіння та горла, оскільки відомо, що інтенсивність сприйняття смаків і тактильні відчуття варіюються залежно від зон язика, піднебіння та горла.

Необхідно наголосити, що потрібно дуже повільно розподілити достатню кількість олії від задньої частини язика до піднебіння та горла, в той час як дегустатор концентрується на порядку, в якому з'являються гіркі та гострі смаки. Якщо цього не зробити, то обидва ці смаки можуть бути не помічені в деяких оліях, або гострота може заглушити гіркий смак.

Здійснення коротких послідовних подихів, втягування повітря через рот дозволяють дегустатору не тільки розповсюдити зразок по усьому роту, але також сприймати легкі ароматичні сполуки через задню частину носа, змушуючи використовувати цей канал.

NB: Коли дегустатори не сприймають фруктовий аромат у зразку, а інтенсивність визначення негативної ознаки складає 3,5 або менше, керівник експертної групи може вирішити організувати для дегустаторів повторний аналіз зразка за температури навколишнього середовища (COI/T.20/Doc. No 6/Rev. 1, Вересень 2007, секція 3 – Загальні специфікації для організації приміщення для випробувань) вказуючи контекст і концепцію температури навколишнього середовища. Коли зразок досягає кімнатної температури, дегустатори мають провести повторну оцінку, лише щоб перевірити, чи відчувається фруктовий аромат. Якщо він відчувається, вони повинні вказати інтенсивність за шкалою.

Необхідно брати до уваги тактильне відчуття гостроти. Для цього рекомендовано проковтнути олію.

▼ M26

9.1.2. При органолептичному оцінюванні оливкової олії холодного пресування першого віджиму рекомендовано під час кожного сеансу оцінювати максимум ЧОТИРИ ЗРАЗКИ, та проводити не більше трьох сеансів на день, щоб уникнути ефекту контрасту, що може бути викликаний безпервною дегустацією інших зразків.

Оскільки послідовні дегустації викликають втому або втрату чутливості, спричинені попередніми зразками, необхідно використовувати продукт, що може усунути з ротової порожнини залишки олії від попередніх дегустацій.

Рекомендовано використовувати невеликий шматок яблука, який після прожовування можна утилізувати в плявальницю. Потім сполоснути ротову порожнину невеликою кількістю води температури навколишнього середовища. Має минути щонайменше 15 хвилин між завершенням одного сеансу та початком наступного.

9.2. Використання форми оцінювання дегустаторами

Форма оцінювання, призначена для використання дегустаторами, детально описана на рисунку 1 у цьому додатку.

Кожен дегустатор з експертної групи нюхає, а потім куштує (⁵) олію, представлену на оцінку. Потім вони мають вказати інтенсивність, з якою вони відчувають кожен з негативних та позитивних ознак за 10-ти

бальною шкалою у наданій формі оцінювання.

Якщо дегустатори відчувають будь-які негативні ознаки, які не вказані в секції 4, вони повинні записати їх в графі «інші», використовуючи термін чи терміни, які найбільш точно описують ознаки.

▼ M28

9.3. Використання даних керівниками експертних груп

Керівник експертної групи збирає форми оцінювання, заповнені кожним дегустатором, та переглядає інтенсивність, присвоєну різним ознакам. Якщо він виявляє будь-яку аномалію, він пропонує дегустатору переглянути його форму оцінювання та, за необхідності, повторити випробування.

Керівник експертної групи вводить дані оцінювання кожного члена експертної групи в комп'ютерну програму на зразок програми, передбаченої в стандарті ІОС/Т.20/Дос. № 15 з метою статистичного розрахунку результатів аналізу, на основі розрахунку їх медіани. Див. пункт 9.4 та доповнення до цього додатка. Дані конкретного зразка вводять за допомогою матриці, що складається з 9 колонок, які представляють 9 сенсорних ознак та n рядків, що представляють n задіяних учасників експертної групи.

Якщо дефект сприймається і вноситься в графу «інші» щонайменше 50% учасників експертної групи, керівник експертної групи повинен підрахувати медіану дефекту і дійти до відповідної класифікації.

Значення робастного коефіцієнта варіації, що визначає класифікацію (дефект з найвищою інтенсивністю і ознака фруктового аромату), не повинно перевищувати 20%.

Якщо має місце протилежний випадок, керівник експертної групи повинен повторити оцінювання спеціального зразка під час іншого сеансу дегустації.

Якщо така ситуація повторюється часто, керівнику експертної групи рекомендовано провести з дегустаторами спеціальну додаткову підготовку (ІОС/Т.20/Дос. № 14 § 5) і використати індекс повторюваності та індекс відхилення для того, щоб перевірити результати дегустатора (ІОС/Т.20/Дос. № 14, § 6).

▼ M32

9.4. Класифікація олії

Олію відносять до наведених нижче класів відповідно до медіани дефектів та медіани за ознакою фруктовості. Медіану дефектів визначають як медіану дефекту, який відчувається найінтенсивніше. Медіана дефектів та медіана ознаки фруктовості виражають з точністю до одного десяткового знаку.

Олію класифікують, порівнюючи медіану дефектів та медіану ознаки фруктовості з порівняльними діапазонами, наведеними нижче. Похибка методу була врахована при встановленні граничних значень згаданих діапазонів, тому їх вважають абсолютними. Пакети програмного забезпечення дозволяють відобразити класифікацію у формі статистичної таблиці або графіка.

- (а) Оливкова олія холодного пресування першого віджиму екстра класу: медіана дефектів — 0,0; медіана фруктової ознаки — більше 0,0;
- (а) Нерафінована оливкова олія холодного пресування першого віджиму: медіана дефектів — більше 0,0 але не більше 3,5; медіана ознаки фруктовості — більше 0,0;
- (а) Лампова оливкова олія холодного пресування першого віджиму: медіана дефектів — більше 3,5 або медіана дефектів менше чи дорівнює 3,5; медіана ознаки фруктовості дорівнює 0,0.

Примітка 1: Коли медіана гіркоти та/або гостроти більше 5,0, керівник експертної групи повинен вказати це в сертифікаті випробування.

Для оцінювань, призначених для моніторингу відповідності, проводять одне випробування. У випадку зустрічних оцінювань аналіз необхідно проводити двічі в різних дегустаційних сеансах. Результати повторного аналізу повинні бути статистично однорідними (див. пункт 9.5). Якщо ні, зразок необхідно проаналізувати ще два рази. Кінцеве значення медіани класифікаційних ознак буде розраховуватися з використанням середнього значення обох медіан.

▼ M29

9.5 Критерії прийняття та відхилення повторних досліджень

Нормалізовану похибку, визначену нижче, використовують, щоб визначити, чи два результати подвійного аналізу є однорідними чи статистично допустимими:

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

Якщо Me_1 та Me_2 є медіанами двох дублікатів (відповідно перший та другий аналіз) та U_1 і U_2 є розширеними невизначеностями, отриманими для двох значень, розрахованими таким чином, як зазначено у доповненні:

$$U_1 = c \times s^* \text{ та}$$

$$s^* = \frac{(CV_r \times Me_1)}{100}$$

Для розширеної невизначеності, $c = 1,96$; звідси:

$$U_1 = 0,0196 \times CV_r \times M_{e1}$$

де CV_r є робастним коефіцієнтом варіації.

Для того, щоб заявити, що два отримані значення статистично не відрізняються, E_n повинно дорівнювати або бути меншим 1,0.

▼ M28

Рисунок 1

ФОРМА ОЦІНЮВАННЯ ОЛИВКОВОЇ ОЛІЇ ХОЛОДНОГО ПРЕСУВАННЯ ПЕРШОГО ВІДЖИМУ

Інтенсивність сприйняття дефектів		
Прілий/мутний осад:		
Гнилісний/відсирілий/землистий		
Винний/оцтовий кислотний/кислий		
Підморожені оливки (волога деревина)		
Згіркий		
Інші негативні ознаки		
Опис:	Металічний <input type="checkbox"/> Сухе сіно <input type="checkbox"/> Червивий <input type="checkbox"/> Грубий <input type="checkbox"/> Розсільний <input type="checkbox"/> Підігрітий або підгорілий <input type="checkbox"/> Сокова вода <input type="checkbox"/> Еспарто <input type="checkbox"/> Огірковий <input type="checkbox"/> Мاستило <input type="checkbox"/>	
Інтенсивність сприйняття позитивних ознак		
Фруктовий		
	Незрілий <input type="checkbox"/>	Стиглий <input type="checkbox"/>
Гіркий		
Гострий		

Ім'я дегустатора:		Код дегустатора:
Код зразка:	Підпис:	
Дата:		
Коментарі:		

▼ M26

Доповнення

Метод розрахунку медіани та довірчих інтервалів

Медіана

$$Me = [p (X < x_m) \leq p (X \leq x_m) \geq$$

Медіану визначають як дійсне число X_m , яке характеризується тим фактом, що вірогідність (p) того, що значення розподілу (X) є нижчим ніж число (X_m), є меншою або рівною 0,5 і що одночасно вірогідність (p) того, що значення розподілу (X) є нижчим або рівним X_m , є більшою або рівною 0,5. Більш практичне означення — медіана це 50-й перцентиль розподілу чисел, розташованих у порядку зростання. Простіше кажучи, це середина впорядкованого ряду непарної кількості чисел або середнє з двох середніх точок впорядкованого ряду парної кількості чисел.

Робастне стандартне відхилення

Щоб отримати достовірну оцінку варіативності навколо середнього значення, необхідно звернутися до робастного стандартного відхилення, згідно з оцінками за Стюартом і Кендаллом (4). Формула дає асимптотичне робастне стандартне відхилення, тобто робастну оцінку варіативності даних, що розглядаються, де N — число спостережень, а IQR — міжквартильний діапазон, який охоплює рівно 50% випадків даного розподілу ймовірностей:

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

Міжквартильний діапазон розраховується шляхом розрахунку різниці між 75-м і 25-м перцентилями.

$$\text{IQR} = 75\text{th percentile} - 25\text{th percentile}$$

Де перцентиль є значенням X_{pc} , що характеризується тим фактом, що ймовірність (p) того, що значення розподілу менші ніж X_{pc} , не перевищує задану соту частину і одночасно ймовірність (p) того, що значення розподілу менше або дорівнює X_{pc} , більше та дорівнює заданій сотій частині. Соту частину вказує на обраний квантиль розподілу. У випадку, коли медіана дорівнює 50/100.

$$\text{percentile} = \left[p (X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \quad p (X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100} \right]$$

Для практичних цілей перцентиль є значенням розподілу, що відноситься до конкретної площі, стягнутої кривою розподілу або щільності. Наприклад, 25-й перцентиль представляє собою значення розподілу, яке відповідає площі, рівній 0,25 або 25/100.

У цьому методі процентилі обчислюються на основі реальних значень, які з'являються в матриці даних (процедура обчислення процентилів).

Робастний коефіцієнт варіації (%)

$CV_r\%$ представляє чисте число, що вказує на відсоток варіативності ряду аналізованих чисел. Тому ця величина є дуже корисною для перевірки надійності оцінювачів експертної групи.

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

Довірчі інтервали медіани на 95%

Довірчі інтервали на 95% (значення помилки першого роду, рівне 0,05 або 5%) представляють собою інтервал, в межах якого значення медіани може змінюватися, якщо б можна було повторювати експеримент нескінченну кількість разів. На практиці це вказує на інтервал варіативності випробування в робочих умовах, що виходить із припущення, що його можна повторювати багато разів. Як і у випадку з $CV_r\%$, інтервал допомагає оцінити надійність випробування.

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

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

де $C = 1,96$ для довірчого інтервалу на рівні 95%.

Приклад розрахункового аркуша представлений в додатку I до стандарту ІОС/Т 20/Doc. № 15.

Покликання

- (1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL.SYSTAT Inc.
- (2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica. Maggioli Editore, Rimini.
- (3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook. Elsevier. Amsterdam.
- (4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1. Hafner Publishing Co.
- (5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots. The American Statistician, 32, (2), 12-16.
- (6) ІОС/Т.28/Doc. No 1 вересень 2007, Настанови для акредитації лабораторій для сенсорних випробувань, зокрема щодо оливкової олії першого пресування відповідно до стандарту ISO/IEC 17025:2005.
- (7) ІОС/Т.20/Doc. № 14.
- (8) ІОС/Т.20/Doc. № 15.
- (9) ISO/IEC 17025:05.

▼ M20 _____

▼ M19 _____

▼ B

ДОДАТОК XV

1. ВМІСТ ОЛІЇ В ОЛИВКОВИХ ЗАЛИШКАХ

1.1. Прилади та обладнання

— підходящий екстракційний пристрій, обладнаний круглодонною колбою об'ємом від 200 до 250 мл,

- ванна з електричним підігрівом (наприклад, піщана ванна, водяна баня) або нагрівальна плита,
- аналітичні ваги,
- піч, відрегульована до максимальних 80 °С,
- електрично розігріта піч, обладнана термостатичним пристроєм, регульованим до $103 \pm 2^\circ \text{C}$, і яку можна прокачати з потоком повітря або використовувати при зниженому тиску,
- механічний млин, який легко очищується, і який дозволяє подрібнювати оливкові залишки без підвищення їх температури або без помітної зміни вмісту в них вологи, летючих речовин або речовин, що екстрагуються гексаном,
- екстракційна насадка і вата або фільтрувальний папір, з яких вже вилучені речовини, що виділяються з гексаном,
- ексикатор,
- сито з отворами діаметром 1 мм,
- дрібні частинки попередньо висушеної пемзи.

1.2. Реагент

Нормальний гексан, технічний сорт, який повинен залишати залишок менше ніж 0,002 г на 100 мл при повному випаровуванні.

2. ПРОЦЕДУРА

2.1. Готування випробного зразка

За необхідності використати механічний млин, який був попередньо очищений, щоб змолоти лабораторний зразок, щоб зменшити його до часток, які можуть повністю пройти через сито.

Використати приблизно одну двадцяту частину зразка для завершення процесу очищення млина, відкинути подрібнений матеріал, подрібнити залишок і зібрати, ретельно змішати і проаналізувати без затримки.

2.2. Відібрана проба

Як тільки операція змелювання завершена, зважити приблизно 10 г зразка з точністю до 0,01 г для випробування.

2.3 Підготування екстракційної вставки

Помістити відібрану пробу у вставку і заткнути ваткою. Якщо використовується фільтрувальний папір, обгорнути ним відібрану пробу.

2.4. Попереднє просушування

Якщо оливкові залишки дуже вологі (тобто вологість і вміст летючих речовин більше 10%), виконати попереднє просушування, помістивши завантажену вставку (або фільтрувальний папір) у піч, нагріту протягом відповідного часу, при температурі не більше 80° С, щоб зменшити вміст вологи і летких речовин до менш ніж 10%.

2.5. Підготування круглodonної колби

Зважити з точністю до 1 мг колбу, що містить одну або дві частинки пемзи, попередньо висушеної в печі при $103 \pm 2^\circ \text{C}$, а потім охолодити в ексикаторі не менше однієї години.

2.6. Первинне екстрагування

В екстракційний апарат вставити вставку (або фільтрувальний папір), що містить відібрану пробу. Налити до колби необхідну кількість гексану. Приєднати колбу до апарату для екстрагування та помістити усе до ванни з електричним підігрівом. Налаштувати рівень нагріву таким чином, щоб швидкість відтоку була не меншою, ніж три краплі на секунду (середнє, не сильне кипіння) Після чотирьох годин екстрагування дати охолонути. Вийняти вставку з екстракційного апарату та помістити її в потік повітря, щоб відігнати більшу частину просочувального розчинника.

2.7. Вторинне екстрагування

Покласти вміст вставки в мікрмельний апарат і змолоти якнайдрібніше. Повернути змелену суміш у вставку без втрат і помістити назад в екстракційний апарат.

Продовжувати екстрагування протягом ще двох годин, використовуючи ту саму круглдонну колбу, що містить первинний екстракт.

Отриманий розчин у екстракційній колбі повинен бути прозорим. Якщо це не так, відфільтрувати його через фільтрувальний папір та кілька разів промити оригінальну колбу та фільтрувальний папір гексаном. Зібрати фільтрат та миючий розчинник у другій круглдонній колбі, яка була висушена і відтарована з точністю до 1 мг.

2.8. Видалення розчинника і зважування екстракту

Видалити більшу частину розчинника шляхом дистиляції у ванні з електричним нагрівом. Видалити останні сліди розчинника, нагріваючи колбу в печі за $103 \pm 2^\circ \text{C}$ протягом 20 хвилин. Сприяти процесу елімінації або продувкою повітрям, або, краще, інертним газом з інтервалами або з використанням зниженого тиску.

Залишити колбу в ексикаторі охолоджуватися на щонайменше одну годину і зважити з точністю до 1 мг.

Нагрівати знову 10 хвилин за тих самих умов, охолодити в ексикаторі і переважити.

Різниця між двома зважуваннями не повинна перевищувати 10 мг. Якщо це не так, нагрівати ще раз протягом 10 хвилин, потім знову охолодити і зважити, допоки різниця у вазі не буде складати 10 мг або менше. Записати останню вагу колби.

Провести повторні визначення на випробному зразку.

3. ВИРАЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Метод розрахунку і формула

(а) Екстракт, виражений як масова частка отриманого продукту дорівнює:

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

де: S = масова частка екстракту продукту в тому вигляді, в якому він отриманий, m_0 = маса, в грамах, відібраної проби, m_1 = маса, в грамах, екстракту після висушування.
--

За результат беруть середнє арифметичне повторних визначень, забезпечуючи виконання умов повторюваності.

Виражають результат з точністю до одного знаку після коми.

(b) Екстракт виражається на основі сухої речовини за формулою:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{oil percentage of extract on a dry basis}$$

де:

S = це відсоток екстракту, отриманого з продукту (див.(а)),

U = це його вологість та вміст летких речовин.

3.2. Повторюваність

Різниця між подвійними визначеннями, проведеними одночасно або швидко одне за одним тим самим аналітиком, не повинна перевищувати 0,2 г екстракту гексану на 100 г зразка.

Якщо ця умова не виконується, повторюють аналіз на двох інших відібраних пробах. Якщо в цьому випадку різниця також перевищує 0,2 г, прийняти як результат середнє арифметичне чотирьох визначень.

ДОДАТОК XVI

ВИЗНАЧЕННЯ ЙОДНОГО ЧИСЛА

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Цей Міжнародний стандарт встановлює метод визначення йодного числа тваринних та рослинних жирів та олій, які далі називають жирами.

2. ТЕРМІНИ ТА ОЗНАЧЕННЯ

Для цілей цього Міжнародного стандарту використовують такі терміни та означення:

2.1. *йодне число*. Маса йоду, що поглинається зразком в робочих умовах, зазначених у цьому Міжнародному стандарті.

Йодне число виражається у грамах йоду на 100 г зразка.

3. ПРИНЦИП

Розчинення відібраної проби в розчиннику і додавання реагенту $Wijs$. Через певний час додавання розчину йодиду калію і води та титрування вивільненого йоду розчином тіосульфату натрію.

4. РЕАГЕНТИ

Всі реагенти повинні мати визнаний аналітичний клас:

4.1. *вода*, що відповідає вимогам ISO 3696, 3 клас.

4.2. *йодид калію*, розчин 100 г/л, що не містить йодату або вільного йоду.

4.3. *крохмаль*, розчин.

Розмішати 5 г розчинного крохмалю в 30 мл води, додати цю суміш до 1 000 мл киплячої води, кип'ятити впродовж трьох хвилин та дати охолонути.

4.4. *тіосульфат натрію*, стандартний об'ємний розчин $c(Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O) = 0,1$ моль/л, стандартизований не більше ніж за сім днів до використання.

4.5. *розчинник*, приготований шляхом змішування рівних об'ємів циклогексану та оцтової кислоти.

4.6. *реагент $Wijs$* , що містить хлористий йод в оцтовій кислоті. Використовується доступний у продажу реагент $Wijs$.

5. АПАРАТУРА

Звичайне лабораторне обладнання, зокрема таке:

5.1. *скляні зважувальні ложки*, придатні для відібраної проби та для введення в колби (6.2).

5.2. *конічні колби*, об'ємом 500 мл, оснащені притертими скляними пробками і повністю сухі.

6 ГОТУВАННЯ ВИПРОБНОГО ЗРАЗКА

Гомогенізований зразок сушать сульфатом натрію та фільтрують.

7. ПРОЦЕДУРА

7.1. Відібрана проба

Маса відібраної проби варіюється залежно від очікуваного йодного числа, як показано в таблиці 1.

Таблиця 1

Очікуване йодне число	Маса відібраної проби (g)
менше 5	3,00
від 5 до 20	1,00
від 21 до 50	0,40
51-100	0,20
101-150	0,13
151-200	0,10

Зважити відібрану пробу з точністю до 0,1 мг у скляній зважувальній ложці (5.1).

7.2. Визначення

Помістити відібрану пробу до колби ємністю 500 мл (6.2). Додати 20 мл розчинника (4.5), щоб розчинити жир. Додати рівно 25 мл реагенту Wijs, вставити пробку, збовтати по колу вміст колби та помістити її в темне місце. Не використовувати піпетку для реагента Wijs.

Подібним чином приготувати сліпу пробу з розчинником та реагентом, але без відібраної проби.

Для зразків з йодним числом нижче 150 — залишити колби в темному місці на одну годину; для зразків з йодним числом більше 150 та для полімеризованих продуктів або значною мірою окиснених продуктів — залишити на дві години.

Наприкінці цього часу додати 20 мл розчину йодиду калію (4.2.) та 150 мл води (4.1) до кожної колби.

Титрувати зі стандартним об'ємним розчином тіосульфату натрію (4.4), доки жовте забарвлення, викликане наявністю йоду, не зникне майже повністю. Додати кілька крапель розчину крохмалю (4.3) та продовжувати титрування, доки в результаті активного збовтування не зникне блакитне забарвлення.

Примітка:

Дозволено потенціометричне визначення кінцевої точки.

7.3. Кількість визначень

Провести два визначення на одному і тому ж випробному зразку.

8. ВИРАЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Йодне число виражають за допомогою такої формули

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

де:

c = числове значення точної концентрації, в молях на літр, використовуваного стандартного об'ємного розчину тіосульфату натрію (4.4);

V_1 = числове значення об'єму, в мілілітрах, стандартного об'ємного розчину тіосульфату натрію (4.4), використаного для контрольного дослідження;

V_2 = числове значення об'єму, в мілілітрах, стандартного об'ємного розчину тіосульфату натрію (4.4), використаного для визначення;

m = числове значення маси, в грамах, відібраної проби (7.1).

Як результат береться середньоарифметичне значення двох визначень, за умови, що виконуються вимоги щодо повторюваності (9.2).

▼ M11

ДОДАТОК XVII

МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ СТИГМАСТАДІЕНІВ У РОСЛИННИХ ОЛІЯХ

1. МЕТА

Визначення стигмастадієнів у рослинних оліях, що містять низькі концентрації згаданих вуглеводнів, зокрема в оливковій олії холодного пресування першого віджиму та сирій олії з оливкових залишків.

2. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Стандарт можна застосовувати до всіх рослинних олій, хоча вимірювання є надійними лише тоді, коли вміст згаданих вуглеводнів становить 0,01-4,0 мг/кг. Метод зокрема підходить для виявлення присутності рафінованих рослинних олій (оливкових, з оливкових залишок, соняшникових, пальмових тощо) в оливковій олії холодного пресування першого віджиму, оскільки рафіновані олії містять стигмастадієни, в той час як олії холодного пресування першого віджиму їх не містять.

3. ПРИНЦИП

Відокремлення неомилуваної речовини. Розділення фракції стероїдних вуглеводнів за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі та аналіз за допомогою капілярної газової хроматографії.

4. ПРИЛАДИ ТА ОБЛАДНАННЯ

- 4.1. Колби об'ємом 250 мл, що підходять для використання зі зворотнім конденсатором.
- 4.2. Ділильні лійки ємністю 500 мл.
- 4.3. Круглодонні колби об'ємом 100 мл.
- 4.4. Ротаційний випарник.
- 4.5. Скляна хроматографічна колонка (внутрішній діаметр — 1,5-2,0 см, довжина — 50 см) з тефлоновою втулкою та заглушкою зі скловати чи диском зі спеченого скла на дні. Щоб приготувати колонку силікагелю, налити гексан до хроматографічної колонки до висоти близько 5 см, а потім наповнити її суспензією силікагелю в гексані (15 г у 40 мл) за допомогою порцій гексану. Дати осісти та завершити процес осідання за допомогою легкої вібрації. Додати безводний сульфат натрію до висоти близько 0,5 см, після чого елюювати надлишок гексану.
- 4.6. Газовий хроматограф з полум'яно-іонізаційним детектором, розділеним або холодним інжектором на колонці та пічкою, що програмується в межах $\pm 1^\circ \text{C}$.
- 4.7. Капілярна колонка з плавленого кварцу для газової хроматографії (внутрішній діаметр — 0,25 або 0,32 мм, довжина — 25 м) покрита 5%-фенілметилсиліконовою фазою, товщина плівки — 0,25 мм.

Примітка 1:

Можна використовувати інші колонки схожої або нижчої полярності.

- 4.8. Інтегратор-реєстратор з можливістю режиму інтеграції найнижча точка-найнижча точка.
- 4.9. Мікрошприц ємністю 5-10 мл для газової хроматографії з впаяною голкою.
- 4.10. Електричний колбонагрівач або гаряче місце.

5. РЕАГЕНТИ

Якщо не передбачено інше, усі реагенти мають бути аналітичної якості. Використовувана вода має бути дистильованою або принаймні аналогічної чистоти.

▼ M32

5.1. Гексан або суміш алканів з інтервалом точки кипіння 65-70 °С, дистильовані ректифікаційною колонкою. Гексан можна замінити ізо-октаном (2,2,4-триметилпентан для хроматографії) за умови досягнення порівнюваних значень точності. Можна контролювати залишок після випаровування 100 мл розчинника. Розчинники з більш високою температурою кипіння, ніж n-гексан, випаровуються довше. Однак їм віддають перевагу через токсичність гексану.

▼ M11

5.2. Етанол 96 об/об.

5.3. Безводний сульфат натрію.

5.4. Спиртовий розчин гідроксиду калію, 10%. Додають 10 мл води до 50 г гідроксиду калію, збовтують по колу, потім розчиняють суміш в етанолі до 500 мл.

Примітка 3:

Спиртовий розчин гідроксиду калію набуває коричневого кольору при настоюванні. Його треба готувати свіжим щодня і зберігати у добре закритій пляшці з темного скла.

5.5. Силікагель 60 для колонкової хроматографії, 70-230 меш (Merck, референтний номер 7734, або подібний).

Примітка 4:

Зазвичай силікагель можна використовувати безпосередньо з ємності без жодної обробки. Тим не менш, деякі партії силікагелю можуть мати низьку активність, що призводить до поганого хроматографічного розділення. За таких обставин силікагель необхідно обробити таким чином: Силікагель активувати, нагріваючи мінімум упродовж чотирьох годин до 550 °С. Після нагрівання помістити силікагель в ексікатор, поки гель охолоджується, а потім перемістити силікагель до колби, закритої кришкою. Додати 2% води та збовтати, доки грудки не розчиняться і порошок не почне вільно розподілятися у рідині.

Якщо партії силікагелю викликають у хроматограмах піки, що накладаються, силікагель необхідно обробити як зазначено вище. Як альтернативу можна використати силікагель 60 найвищого ступеня очистки (Merck, посилання 7754).

5.6. Вихідний розчин (200 ppm) холеста-3,5-дієну (Сігма, 99-типроцентної чистоти) в гексані (10 мг в 50 мл).

5.7. Стандартний розчин холеста-3,5-дієн гексану з концентрацією 20 ppm, отриманий шляхом розбавлення згаданого вище розчину.

Примітка 5:

Розчини 5.6 та 5.7 є стабільними впродовж щонайменше чотирьох місяців, якщо зберігати їх при температурі нижче 4 °С.

5.8. Розчин n-нонакану в гексані з концентрацією близько 100 ppm.

5.9. Газ-носій для хроматографії: гелій або водень, з чистотою 99,9990%.

5.10. Допоміжні гази для полум'яно-іонізаційного детектора: водень з чистотою 99,9990% та очищене повітря.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1. Приготування неомильної речовини

6.1.1. Зважити $20 \pm 0,1$ г олії в колбі об'ємом 250 мл (4.1), додати 1 мл стандартного розчину холеста-3,5-дієну (20мкг) та 75 мл спиртового розчину гідроксиду калію 10%, під'єднати зворотній охолоджувач і нагрівати до легкого кипіння протягом 30 хвилин, забрати колбу зі зразком з нагріву і дозволити розчину трохи охолонути (не дозволяти охолонути повністю, оскільки зразок осяде). Додати 100 мл води та перемістити розчин до ділильної лійки (4.2) за допомогою 100 мл гексану. Інтенсивно збовтати суміш упродовж 30 секунд і дати розділитися.

Примітка 6:

Якщо утворюється емульсія, що швидко не зникає, додати невелику кількість етанолу.

- 6.1.2. Перемістити водну фазу з нижньої частини у другу ділительну лійку і повторити екстрагування, додавши 100 мл гексану. Знову дати стекти нижній фазі та промити екстракти гексану (зібрані в іншій ділительній лійці) тричі з 100 мл водно-етанолової суміші (1:1) кожного разу, доки не буде досягнутий нейтральний рівень рН.
- 6.1.3. Пропустити розчин гексану через безводний сульфат натрію (50 г), промити 20 мл гексану та випарувати у ротаційному випарнику при 30 °С та зниженому тиску до висихання.

6.2. Розділення фракції стероїдних вуглеводнів

- 6.2.1. Зібрати залишок до колонки для фракціонування за допомогою двох порцій гексану по 1 мл, налити зразок в колонку, щоб шар розчину опинився на шарі сульфату натрію та почати хроматографічне елюювання гексаном зі швидкістю потоку близько 1 мл/хв. Відкинути перші 25-30 мл елюату, а потім зібрати наступні 40 мл фракції. Після збирання перенести цю фракцію до круглодонної колби об'ємом 100 мл (4.3).

Примітка 7:

Перша фракція містить насичені вуглеводні (рисунок 1 а), а друга — стероїдні. Подальше елюювання дозволяє отримати сквален та пов'язані з ним складові. Щоб досягнути гарного розділення між насиченими та стероїдними вуглеводнями, необхідно оптимізувати об'єми фракцій. Для цього об'єм першої фракції необхідно узгодити таким чином, щоб при аналізі другої фракції піки, що представляють насичені вуглеводні, були низькими (див. рисунок 1 с); якщо вони не з'являються, а інтенсивність стандартних піків низька, необхідно зменшити об'єм. У будь-якому разі, повне розділення між компонентами першої та другої фракції не є необхідним; оскільки під час аналізу методом газової хроматографії не відбувається накладання піків, якщо умови газової хроматографії узгоджені, як зазначено у пункті 6.3.1. Загалом оптимізація об'єму другої фракції не потрібна, оскільки існує гарне розділення з подальшими компонентами. Тим не менш, наявність великого піку при приблизно 1,5 хвилинах меншого часу утримання, ніж стандарт, обумовлена скваленом, і це свідчить про погане розділення.

- 6.2.2. Випарувати другу фракцію в ротаційному випарнику при 30 °С та зниженому тиску до висихання, відразу ж розчинити залишок у 0,2 мл гексану. Зберігати розчин в холодильнику до проведення аналізу.

Примітка 8:

Залишки 6.1.3 та 6.2.2 не можна зберігати сухими та за кімнатної температури. Відразу після їх отримання необхідно додати розчинник, а розчини необхідно зберігати в холодильнику.

6.3. Газова хроматографія

- 6.3.1. Робочі умови для розділеного введення:

- температура інжектора: 300 °С,
- температура детектора: 320 °С,
- інтегратор-реєстратор: параметри інтеграції повинні фіксуватися, щоб дати правильну оцінку площ. Рекомендовано режим інтеграції найнижча точка-найнижча точка,
- чутливість: приблизно в 16 разів більша ніж мінімальне затухання.
- кількість розчину, який вводять: 1мкл,
- температура програмування печі: початкові 235 °С впродовж шести хвилин, потім збільшення на 2 °С/хв до 285 °С,
- інжектор з розділювачем потоку 1:15,
- газ-носії: гелій або водень при близько 120 кПа тиску.

Ці умови можна підлаштовувати відповідно до характеристик хроматографа та колонки, щоб отримати хроматограми, що відповідають таким вимогам: формування внутрішнього стандартного піку впродовж близько п'яти хвилин від часу, вказаного в пункті 6.3.2; внутрішній стандартний пік має становити щонайменше 80% усієї шкали.

Необхідно перевірити систему для газової хроматографії, ввівши суміш базового розчину холестадієну (5.6) та розчину n-нонакозану (5.8). Пік холеста-3,5-дієну має з'явитися до появи піку n-нонакозану (рисунок 1 с); якщо цього не відбулося, можна зробити наступні дві дії: зменшити температуру печі та/або використовувати менш полярну колонку.

6.3.2. Визначення піку

Внутрішній стандартний пік з'являється приблизно за 19 хвилин, а 3,5-стигмастадієн за відносного часу утримання близько 1,29 (див. рисунок 1b). 3,5-стигмастадієн зустрічається з невеликою кількістю ізомеру і зазвичай обидва елюються разом як один хроматографічний пік. Тим не менш, якщо колонка надто полярна або має високу роздільну здатність, ізомер може утворити невеликий пік перед піком стигмаста-3,5-дієну (рисунок 2). Для забезпечення того, щоб стигмастадієни елювалися як один пік, рекомендовано замінити колонку такою, що матиме меншу полярність або більший внутрішній діаметр.

Примітка 9:

Стигмастадієни для референтних значень можна отримати в результаті аналізу рафінованої рослинної олії, використовуючи меншу кількість зразка (1-2 г). Стигмастадієни утворюють високий та легко визначуваний пік.

6.3.3. Кількісний аналіз

Вміст стигмастадієнів визначають відповідно до формули:

мг/кг стигмастадієнів =

$$\frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

де: A_s = площа піку стигмастадієнів (якщо пік розділений на два ізомери — сума площ двох піків),
 A_c = площа внутрішнього стандарту (холестадієн),
 M_c = маса доданого стандарту, в мікрограмах,
 M_o = маса взятої олії, в грамах.

Поріг виявлення: близько 0,01 мг/кг.

▼ M32

Примітка 10: Коли стигмастадієни виявляються в концентраціях більше 4 мг/кг, якщо потрібне кількісне визначення, слід застосовувати метод Міжнародної ради оливкової олії для визначення стеренів у рафінованій олії.

▼ M11

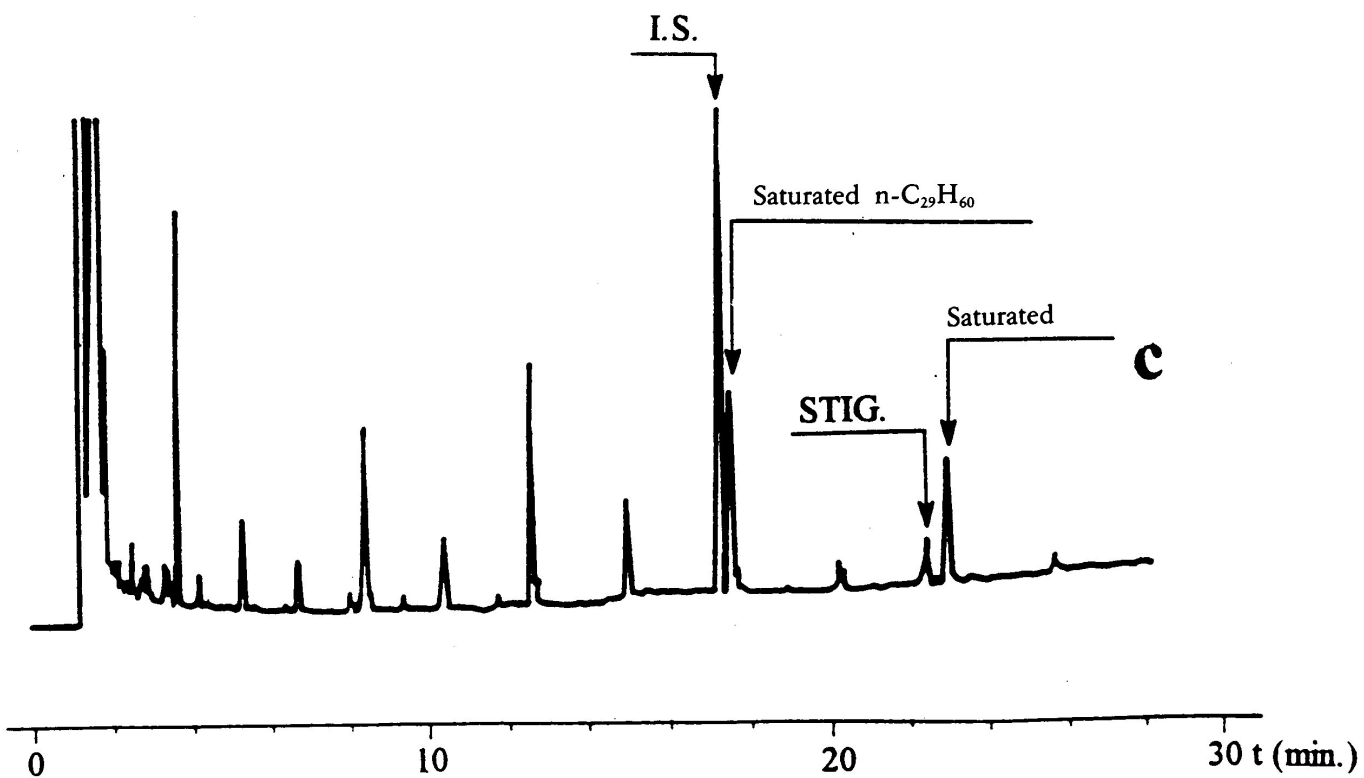
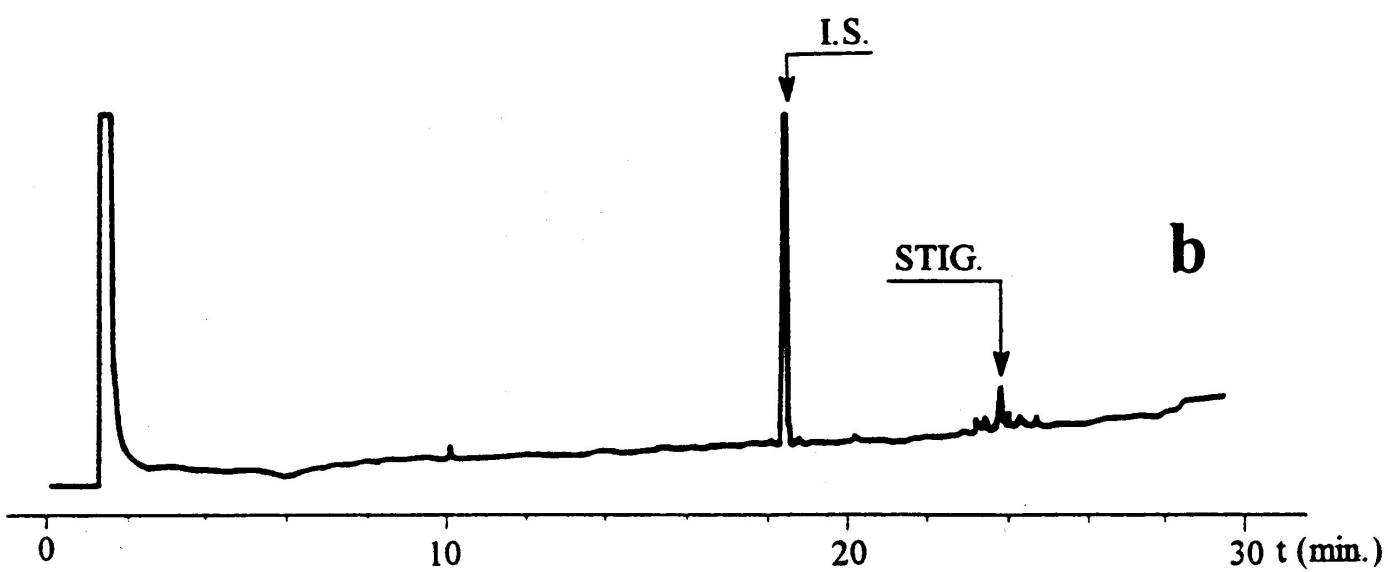
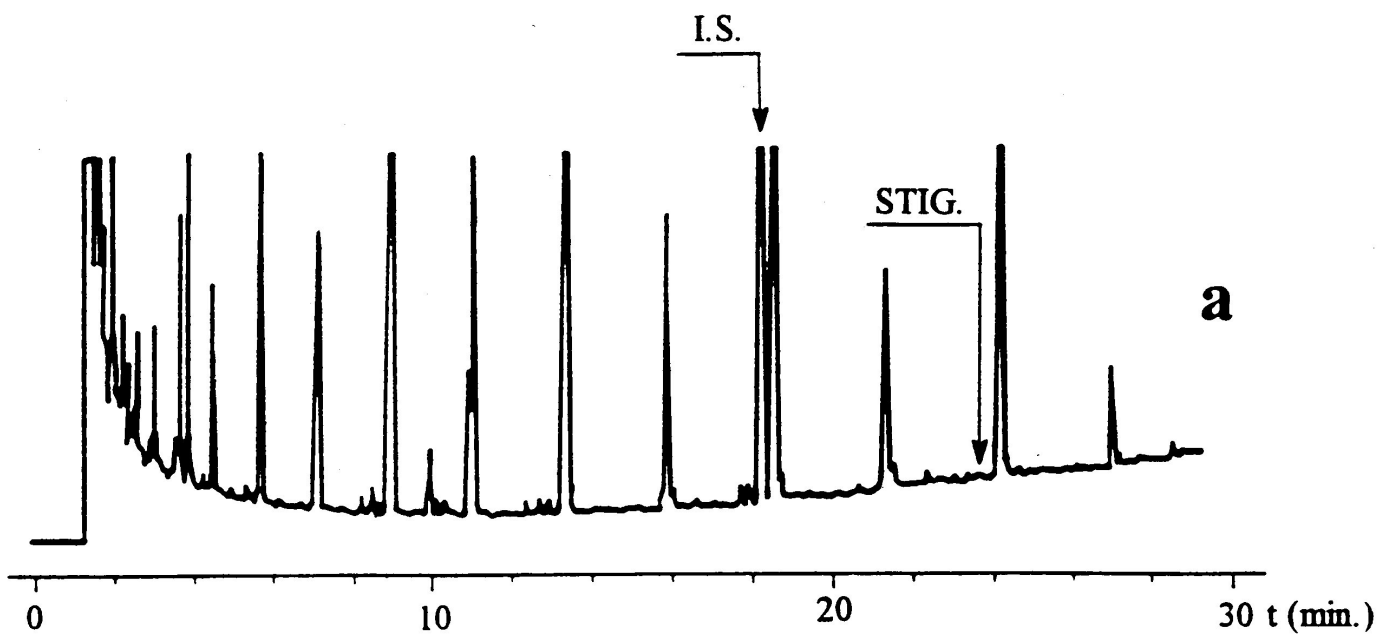


Рисунок 1

Газові хроматограми, отримані зі зразків оливкової олії, проаналізованих на капілярній колонці з плавненого кварцу (внутрішній діаметр — 0,25 мм на 25 м), вкритій 5%-фенілметилсиліконом, товщина плівки — 0,25 мкм.

- (a) Перша фракція (30 мл) з оливкової олії першого пресування, змішана зі стандартом.
- (b) Друга фракція (40 мл) з оливкової олії, що містить 0,10 мг/кг стигмастадієнів.
- (c) Друга фракція (40 мл), що містить невелику частку першої фракції.

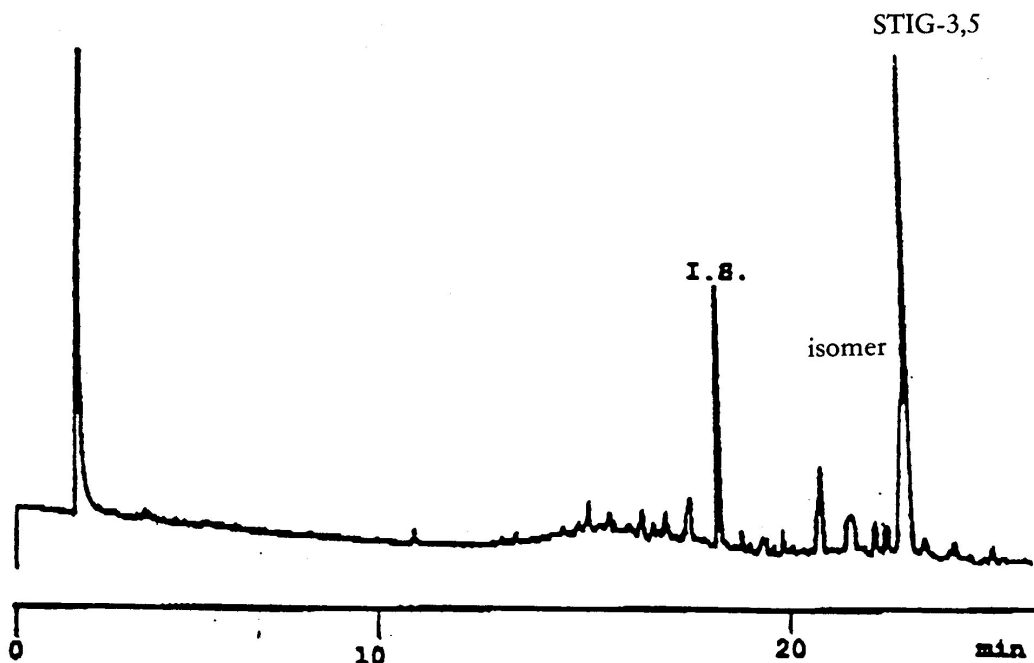


Рисунок 2

Газова хроматограма, отримана зі зразка рафінованої оливкової олії, проаналізованого на колонці DB-5, що демонструє ізомер 3,5-стигмастадієну.

▼ M25

ДОДАТОК XVIII

ВИЗНАЧЕННЯ РІЗНИЦІ МІЖ ФАКТИЧНИМ ТА ТЕОРЕТИЧНИМ ВМІСТОМ ТРИАЦИЛГЛІЦЕРОЛІВ З ECN 42

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Визначення абсолютної різниці між експериментальними значеннями триацилгліцеролів (ТАГ) з еквівалентною кількістю атомів вуглецю 42 (ECN 42_{ВЕРХ}), отриманою шляхом визначення в олії за допомогою високоефективної рідинної хроматографії і теоретичним значенням ТАГ з еквівалентною кількістю атомів вуглецю 42 (ECN 42_{теоретичне}), розрахованою зі складу жирної кислоти.

2. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Стандарт застосовний до оливкових олій. Метод застосовують для виявлення наявності невеликої кількості олій з насіння (багатої на лінолеву кислоту) в кожному класі оливкових олій.

3. ПРИНЦИП

Вміст триацилгліцеролів з ECN 42, визначений за допомогою аналізу ВЕРХ, і теоретичний вміст триацилгліцеролів з ECN 42 (розрахований на основі визначення складу жирних кислот методом газорідинної

хроматографії), відповідає певному граничному значенню для справжніх оливкових олій. Різниця, що перевищує показники, прийняті для кожного типу олії, вказує на те, що олія містить олії з насіння.

4. МЕТОД

Метод для розрахунку теоретичного вмісту триацилгліцеролів з ECN 42 та різниці з врахуванням даних ВЕРХ в основному відбувається шляхом координування аналітичних даних, отриманих завдяки іншим методам. Можна розрізнити три фази: визначення складу жирної кислоти методом капілярної газової хроматографії, розрахунок теоретичного складу триацилгліцеролів з ECN 42, визначення ECN 42 триацилгліцеролів за допомогою ВЕРХ.

4.1. Прилади та обладнання

4.1.1. Круглодонні колби, 250 та 500 мл.

4.1.2. Мензурки 100 мл.

4.1.3. Склона хроматографічна колонка, внутрішній діаметр — 21 мм, довжина — 450 мм, оснащена краном та нормалізованим конусом (внутрішнім) у верхній частині.

4.1.4. Ділильні лійки, 250 мл, з нормалізованим конусом (зовнішнім) у нижній частині, придатним для з'єднання з верхньою частиною колони.

4.1.5. Склона паличка довжиною 600 мм.

4.1.6. Склона лійка діаметром 80 мм.

4.1.7. Мірні колби, 50 мл.

4.1.8. Мірні колби, 20 мл.

4.1.9. Ротаційний випарник.

4.1.10. Високоєфективний рідинний хроматограф, що забезпечує термостатичний контроль температури колонки.

4.1.11. Ввідні пристрої для введення 10 мкл.

4.1.12. Детектор: диференційний рефрактометр. Повномасштабна чутливість має становити щонайменше 10^{-4} одиниць показника заломлення.

4.1.13. Колонка: труба з нержавіючої сталі довжиною 250 мм з внутрішнім діаметром 4,5 мм, наповнена часточками кварцу діаметром 5 мкм, що містять 22-23% вуглецю у формі октадецилсилану.

4.1.14. Програмне забезпечення для обробки даних.

4.1.15. Флакони об'ємом близько 2 мл, з тефлоновою прокладкою та нагвинчувальними ковпачками.

4.2. Реагенти

Реагенти мають бути аналітичної чистоти. Розчинники для елюювання повинні бути дегазовані і можуть бути перероблені декілька разів, що не вплине на розділення.

▼ M32

4.2.1. Пертролейний ефір 40-60 °С, хроматографічний клас, або гексан. Гексан можна замінити ізо-октаном (2,2,4-триметилпентан для хроматографії) за умови досягнення порівнюваних значень точності. Розчинники з більш високою температурою кипіння, ніж n-гексан, випаровуються довше. Однак їм віддають перевагу через токсичність гексану.

▼ M25

4.2.2. Етиловий ефір, без перекису, щойно дистильований.

4.2.3. Розчинник для елюювання для очищення олії сумішшю для колонкової хроматографії петролейного ефіру/етилового ефіру 87/13 (об/об)).

4.2.4. Силікагель, 70-230 меш, тип Merck 7734, зі стандартизованим рівнем води 5% (м/м).

4.2.5. Скловата.

4.2.6. Ацетон для ВЕРХ.

4.2.7. Ацетонітрил або пропіонітрил для ВЕРХ.

4.2.8. Розчинник для елюювання ВЕРХ: ацетонітрил + ацетон (пропорції необхідно відрегулювати, щоб отримати бажане розділення, почати з суміші 50:50) або пропіонітрил.

4.2.9. Розчинник для солюбілізації: ацетон.

4.2.10. Референтні тригліцериди: можна використовувати тригліцериди, що доступні у продажу (трипальмітин, триолеїн тощо), а час їх утримання відмічають на графіку відповідно до еквівалентної кількості атомів вуглецю, або, як альтернатива, отримують референтні хроматограми з соєвої олії, суміші соєвої олії і оливкової олії з чистою оливковою олією 30:70 (див. примітки 1 і 2 та рисунки 1–4).

4.2.11. Колонка для твердофазного екстрагування з фазою кремнію 1 г, 6 мл.

▼ M32

4.2.12. Гептан для хроматографії. Гептан може бути замінений ізо-октаном (2,2,4-триметил пентан в хроматографічному класі).

▼ M25

4.3. Підготування зразка

Оскільки кількість речовин, що накладаються, може призвести до хибних позитивних результатів, зразок завжди необхідно очищувати відповідно до методу IUPAC 2.507, який використовують для визначення полярних сполук у жирах для смаження.

4.3.1. Підготування хроматографічної колонки

Наповнити колонку (4.1.3) приблизно 30 мл розчинника для елюювання (4.2.3), потім ввести до колонки трохи скловати (4.2.5), проштовхуючи її до дна колонки за допомогою скляної палички (4.1.5).

У мензурці ємністю 100 мл приготувати суспензію 25 г силікагелю (4.2.4) у 80 мл суміші для елюювання (4.2.3), потім перемістити її до колонки за допомогою скляної лійки (4.1.6).

Щоб забезпечити повне перенесення силікагелю до колонки, промити мензурку сумішшю для елюювання та також перемістити рідину для промивання до колонки.

Відкрити кран та дозволити розчиннику елюювати з колонки, доки його рівень не досягне приблизно 1 см над силікагелем.

4.3.2. Колонкова хроматографія

Зважити з точністю до 0,001 г, $2,5 \pm 0,1$ г попередньо відфільтровану олію, гомогенізовану та зневоднену, в разі необхідності, у 50 мл мірній колбі (4.1.7).

Розчинити її в приблизно 20 мл розчинника для елюювання (4.2.3). У разі необхідності, трохи нагріти для полегшення розчинення. Охолодити при кімнатній температурі і скоригувати об'єм розчинником для елюювання.

За допомогою мірної піпетки ввести 20 мл розчину в колонку, підготовану відповідно до пункту 4.3.1, відкрити кран і дозволити розчиннику елюювати до рівня шару силікагелю.

Потім елюювати з допомогою 150 мл розчинника для елюювання (4.2.3), регулюючи швидкість потоку розчинника приблизно до 2 мл/хв (150 мл пройдуть через колонку приблизно за 60-70 хвилин).

Елюат відібрати у круглодонну колбу ємністю 250 мл (4.1.1) попередньо відтарувавши у печі і точно зваживши. Елюювати розчинник при зниженому тиску в ротаційному випарнику (4.1.9) і зважити залишок, який буде використовуватися для приготування розчину для аналізу ВЕРХ і для приготування метилового ефіру.

Відновлення зразка з колонки повинно складати щонайменше 90 % для оливкової олії холодного пресування першого віджиму екстра класу, оливкової олії холодного пресування першого віджиму, звичайної, рафінованої оливкової олії і як мінімум 80 % для лампової оливкової олії та оливкової олії з вичавок.

4.3.3. Очищення ТФЕ

Кремнієву колонку ТФЕ активують, пропускаючи 6 мл гексану (4.2.3) під вакуумом, уникаючи висихання.

Зважити з точністю до 0,001 г, 0,12 г у флаконі ємністю 2 мл (4.1.15) та розчинити 0,5 мл гексану (4.2.3).

Заповнити колонку ТФЕ розчином та елюювати 10 мл гексан-діетилового ефіру (87:13 об/об) (4.2.3) у вакуумі.

Зібрану фракцію випарувати до сухості в ротаційному випарнику (4.1.9) при зниженому тиску за кімнатної температури. Залишок розчинити у 2 мл ацетону (4.2.6) для аналізу триацилгліцеролу (ТАГ).

4.4. Аналіз ВЕРХ

4.4.1. Підготування зразків до хроматографічного аналізу

5 %-ний розчин зразка для аналізу готують шляхом зважування $0,5 \pm 0,001$ г зразка у градуйованій колбі ємністю 10 мл і доведення до 10 мл розчином для сольобілізації (4.2.9).

4.4.2. Процедура

Налаштувати хроматографічну систему. Закачати розчинник для елюювання (4.2.8) зі швидкістю 1,5 мл/хв для промивання усієї системи. Чекати до отримання стійкої базової лінії.

Ввести 10 мкл зразка, підготовленого згідно з пунктом 4.3.

4.4.3. Обчислення і вираження результатів

Використовувати метод нормалізації площі, тобто припустити, що сума площ піків, що відповідають ТАГ, від ECN 42 до ECN 52 дорівнює 100 %.

Обчислити відносний відсоток кожного тригліцериду за формулою:

$$\% \text{ triglyceride} = \text{area of peak} \times 100 / \text{sum of peak areas}$$

Результати надати щонайменше з точністю до двох знаків після коми.

Див. примітки 1-4

4.5. Розрахування складу тріацилгліцеролу (моль %) за даними складових жирних кислот (% площі)

4.5.1. Визначення складу жирних кислот

Склад жирних кислот визначають за стандартом ISO 5508 за допомогою капілярної колонки. Метиллові ефіри готують відповідно до COI/T.20/Doc. № 24.

4.5.2. Жирні кислоти для розрахунку

Гліцериди групують за їх еквівалентом карбонового числа (ECN), беручи до уваги наступні еквівалентності між ECN та жирними кислотами. Були враховані тільки жирні кислоти, які мають 16 та 18 атомів вуглецю, оскільки тільки вони важливі для оливкової олії. Жирні кислоти необхідно нормалізувати до 100 %.

Жирна кислота (ЖК)	Абревіатура	Молекулярна маса (MW)	ECN (еквівалентне число атомів вуглецю)
Пальмітинова кислота	P	256,4	16
Пальмітолеїнова кислота	Po	254,4	14
Стеаринова кислота	S	284,5	18
Олеїнова кислота	O	282,5	16

Лінолева кислота	L	280,4	14
Ліноленова кислота	Ln	278,4	12

4.5.3. *Перетворення % площі у молі для всіх жирних кислот (1)*

$\text{moles P} = \frac{\text{area \% P}}{\text{MW P}}$	$\text{moles S} = \frac{\text{area \% S}}{\text{MW S}}$	$\text{moles Po} = \frac{\text{area \% Po}}{\text{MW Po}}$
$\text{moles O} = \frac{\text{area \% O}}{\text{MW O}}$	$\text{moles L} = \frac{\text{area \% L}}{\text{MW L}}$	$\text{moles Ln} = \frac{\text{area \% Ln}}{\text{MW Ln}}$

4.5.4. *Нормалізування молярності жирних кислот до 100 % (2)*

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

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

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

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

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

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

Результат надає відсоток кожної жирної кислоти в молях у загальній (1, 2, 3-) позиції ТАГ.

Потім розраховують суму насичених жирних кислот P та S (SFA) та ненасичених жирних кислот Po, O, L та Ln (UFA) (3):

$$\text{moles \% SFA} = \text{moles \% P} + \text{moles \% S}$$

$$\text{moles \% UFA} = 100 - \text{moles \% SFA}$$

4.5.5. *Розрахунок складу жирної кислоти в 2- і 1, 3- положеннях ТАГ*

Жирні кислоти поділяються на три групи: група для позиції 2 та дві ідентичні групи для позицій 1 і 3 з різними коефіцієнтами для насичених жирних кислот (P і S) та ненасичених (Po, O, L і Ln).

4.5.5.1. *Насичені жирні кислоти в позиції 2 [P(2) і S(2)] (4):*

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

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

4.5.5.2. Ненасичені жирні кислоти в позиції 2 [P(2), O(2), L(2) і Sln(2)] (5):

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

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

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

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

4.5.5.3. Жирні кислоти в позиції 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) і Ln(1,3)] (6):

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

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

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

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

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

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

4.5.6. *Розрахунок триацилгліцеролів*

4.5.6.1. Триацилгліцероли з однією жирною кислотою (AAA, тут LLL, PoPoPo) (7)

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

4.5.6.2. ТАГ з двома жирними кислотами (AAB, тут PoPoL, PoLL) (8)

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

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

4.5.6.3. ТАГ з трьома різними жирними кислотами (ABC, тут OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

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

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

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

4.5.6.4. Триацилгліцероли з ECN42

Триацилгліцероли з ECN42 розраховують відповідно до рівняння 7, 8 і 9, а потім подають у порядку очікуваного елюювання в ВЕРХ (зазвичай, тільки три піки).

LLL

PoLL і позиційний ізомер LPoL

OLLn і позиційний ізомер OLnL і LnOL

PoPoL і позиційний ізомер PoLPo

PoOLn і позиційні ізомери OPoLn і OLnPo

PLLn і позиційні ізомери LLnP і LnPL

PoPoPo

SLnLn і позиційний ізомер LnSLn

PPoLn і позиційні ізомери PLnPo і PoPLn

Триацилгліцероли з ECN42 подають сумою дев'яти триацилгліцеролів включно з їх позиційними ізомерами. Результати надати щонайменше з точністю до двох знаків після коми.

5. ОЦІНЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Розрахований теоретичний вміст та вміст, визначений аналізом ВЕРХ, порівнюють. Якщо різниця в абсолютному значенні даних ВЕРХ мінус теоретичні дані перевищує значення, заявлені для відповідної категорії олії в стандарті, зразок містить олію з насіння.

Результати надають з точністю до двох знаків після коми.

6. ПРИКЛАД (НОМЕРИ СТОСУЮТЬСЯ СЕКЦІЙ У ТЕКСТІ МЕТОДА)

— 4.5.1. *Розрахунок молярного відсотку жирних кислот на основі даних газорідинної хроматографії (нормалізований % площі)*

Для складу жирних кислот за допомогою газорідинної хроматографії отримані такі дані:

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

— 4.5.3 *Перетворення % площі у молі для всіх жирних кислот (див. формулу (1))*

$$\text{молі P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles P}$$

$$\text{молі S} =$$

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

$$\text{молі Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles Po}$$

$$\text{молі O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles O}$$

$$\text{молі L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles L}$$

$$\text{молі Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ moles Ln}$$

$$\text{Усього} = 0,35821 \text{ молі ТАГ}$$

— 4.5.4 *Нормалізація молярності жирних кислот до 100 % (див. формулу (2))*

$$\begin{array}{l} \% \text{ моль=} \\ \text{P(1,2,3)} \end{array} \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 10,887 \%$$

$$\begin{array}{l} \% \text{ моль=} \\ \text{S(1,2,3)} \end{array} \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 2,942 \%$$

$$\begin{array}{l} \% \text{ моль=} \\ \text{Po(1,2,3)} \end{array} \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,097 \%$$

$$\begin{array}{l} \% \text{ моль=} \\ \text{O(1,2,3)} \end{array} \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 74,116 \%$$

$$\begin{array}{l} \% \text{ моль=} \\ \text{L(1,2,3)} \end{array} \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 9,955 \%$$

$$\begin{array}{l} \% \text{ моль=} \\ \text{Ln(1,2,3)} \end{array} \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,002 \%$$

$$\text{Загальний} = 100\%$$

% моль

Сума насичених та ненасичених жирних кислот у 1,2,3-позиції ТАГ (див. формулу (3)):

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

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

— 4.5.5 *Розрахунок складу жирної кислоти в 2- і 1,3-позиціях ТАГ*

— 4.5.5.1. *Насичені жирні кислоти в позиції 2 [P(2) і S(2)] (див. формулу (4)):*

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

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

— 4.5.5.2. Ненасичені жирні кислоти в позиції 2 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) і Ln(1,3)] (див. формулу (5)):

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

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

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

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

— 4.5.5.3. Жирні кислоти в позиціях 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) і Ln(1,3)] (див. формулу(6)):

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

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

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

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

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

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

— 4.5.6. Розрахунок триацилгліцеролів

З розрахованого вмісту жирних кислот в положеннях sn-2- та sn-1,3:

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

Сума	100,0 %	100,0 %
------	---------	---------

розраховують такі триацилгліцероли:

LLL

PoPoPo

PoLL з 1 позиційним ізомером

SLnLn з 1 позиційним ізомером

PoPoL з 1 позиційним ізомером

PPoLn з 2 позиційними ізомерами

OLLn з 2 позиційними ізомерами

PLLn з 2 позиційними ізомерами

PoOLn з 2 позиційними ізомерами

— 4.5.6.1. ТАГ з однією жирною кислотою (LLL, PoPoPo) (див. формулу (7))

$$\text{mol \% LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\,000} = 0,09706 \text{ моль LLL}$$

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

— 4.5.6.2. ТАГ з двома жирними кислотами (PoLL, SLnLn, PoPoL) (див. формулу (8))

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

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

0,03210 моль PoLL

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

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

0,00094 моль SLnLn

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

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

0,00354 моль PoPoL

— 4.5.6.3. ТАГ з трьома різними жирними кислотами (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) (див. формулу (9))

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

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

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

0,00761 моль PPoln

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

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

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

0,43655 моль OLLn

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

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

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

0,06907 моль PLLn

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

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

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

0,04812 моль PoOLn

ECN42 = 0,69512 моль ТАГ

Примітка 1: Порядок елюювання можна визначити шляхом розрахунку еквівалентної кількості атомів вуглецю, яка часто визначається співвідношенням

$ECN = CN - 2n$, де CN — це кількість атомів вуглецю, n — число подвійних зв'язків; його можна точніше розрахувати, враховуючи походження подвійного зв'язку. Якщо n_o , n_l та n_{ln} — кількість подвійних зв'язків, віднесених відповідно до олеїнової, лінолевої та ліноленової кислот, то еквівалентна кількість атомів вуглецю може бути розрахована за допомогою співвідношення формули:

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

де коефіцієнт d_o , d_l і d_{ln} може бути розрахований за допомогою референтних тригліцеридів. За умов, зазначених у цьому методі, отримане співвідношення буде близьким до:

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

Примітка 2: З кількома референтними тригліцеридами також можна розрахувати роздільну здатність відносно триолеїну:

$$\alpha = RT^1 / RT$$

триолеїн, використовуючи скорочений час утримання

$$RT^1 = RT - RT \text{ solvent}$$

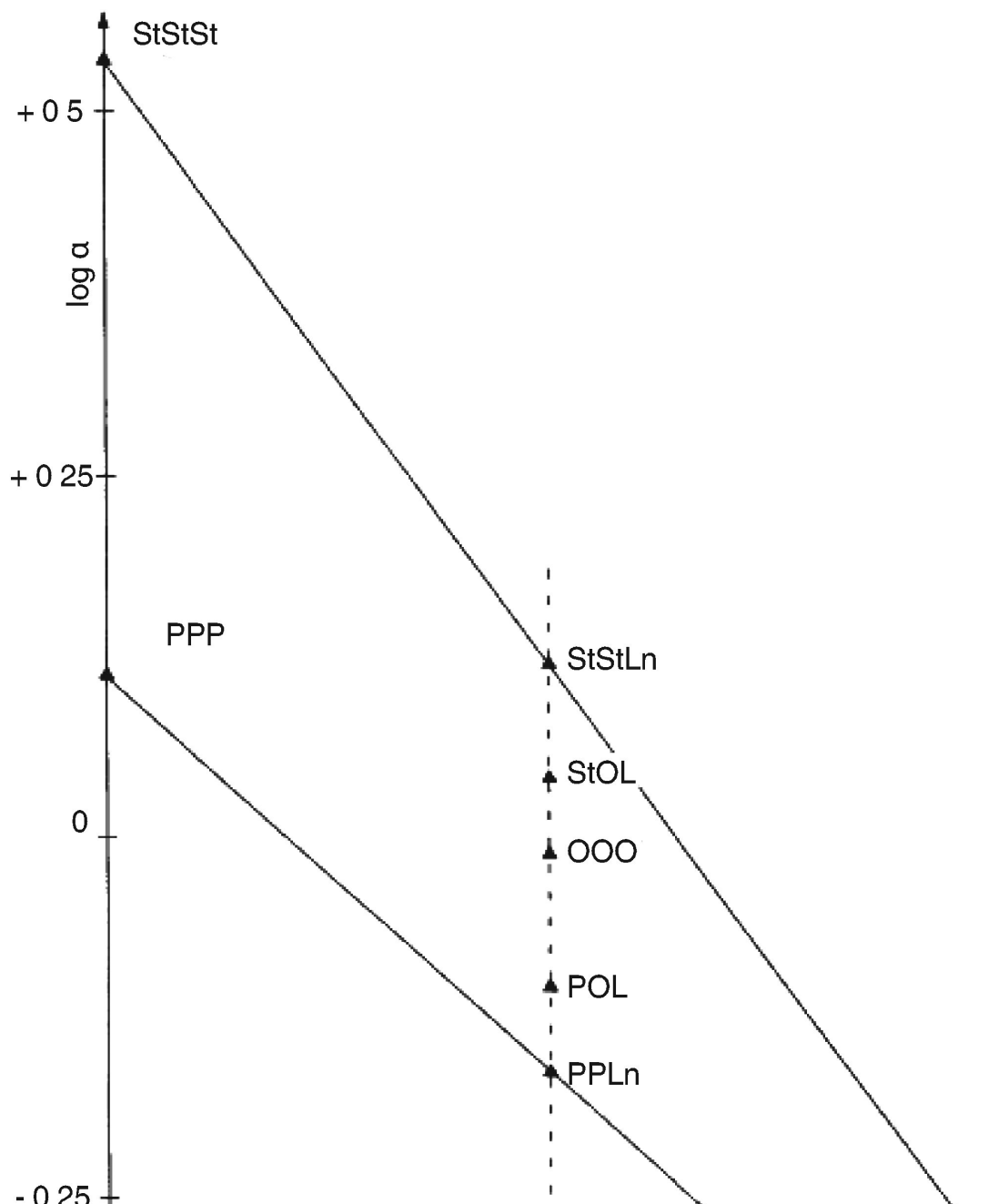
Графік $\log \alpha$ по відношенню до f (кількість подвійних зв'язків) дозволяє визначити значення утримання для всіх тригліцеридів жирних кислот, що містяться в референтних тригліцеридах, – див. рисунок 1.

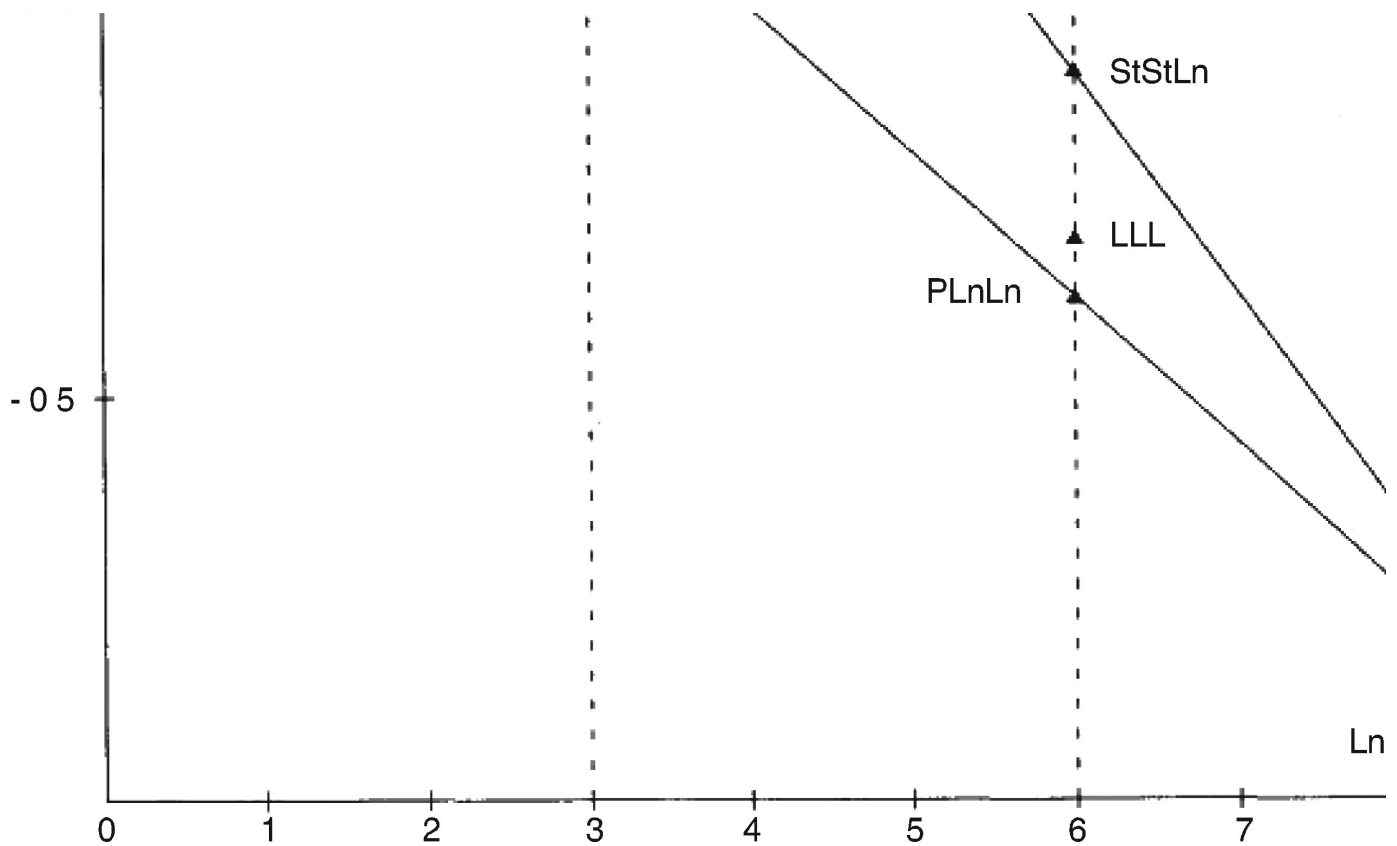
Примітка 3: Ефективність колонки повинна дозволяти чітке розділення піку трилінолеїну від піків тригліцеридів з сусідніми RT . Елюювання проводять до піку $ECN 52$.

Примітка 4: Правильне вимірювання площ усіх піків, що представляють інтерес для даного визначення, забезпечується, якщо другий пік, що відповідає $ECN 50$, становить 50% від повної шкали реєстратора.

Рисунок 1

Графік $\log \alpha$ проти f (кількість подвійних зв'язків)



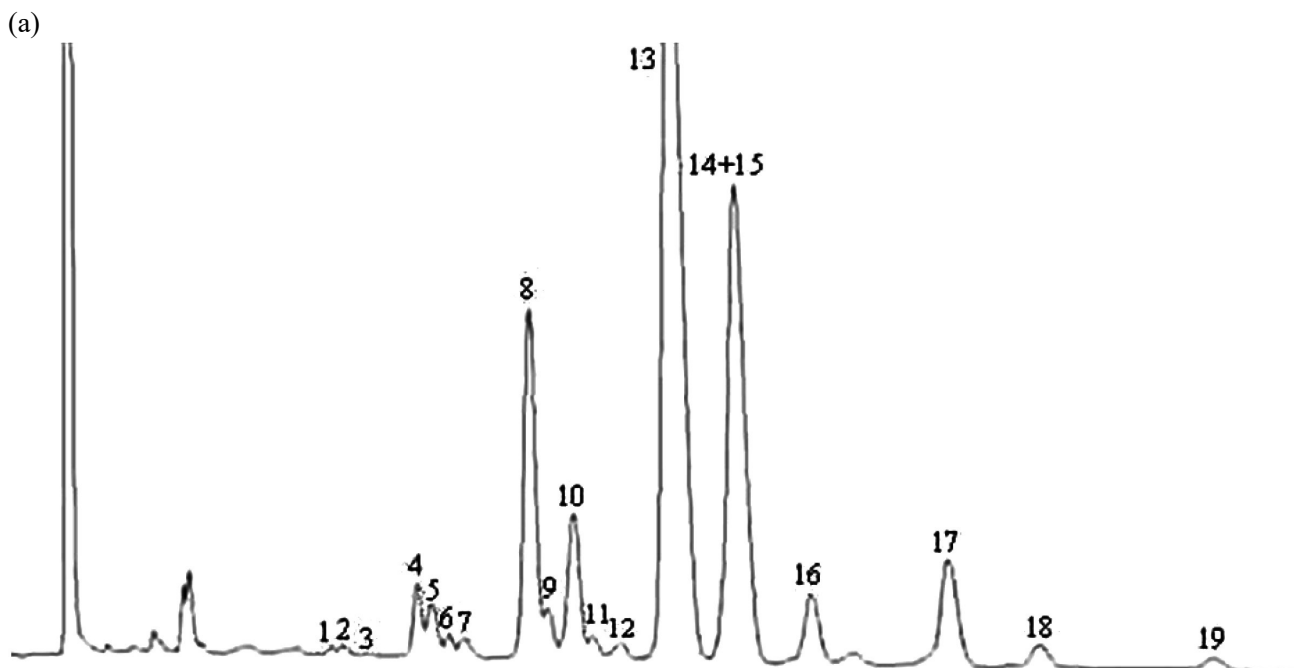


Кількість подвійних зв'язків

La: лауринова кислота; Му: міристинова кислота; P: пальмітинова кислота; S: стеаринова кислота; O: олеїнова кислота; L: лінолева кислота; Ln: ліноленова кислота

Рисунок 2

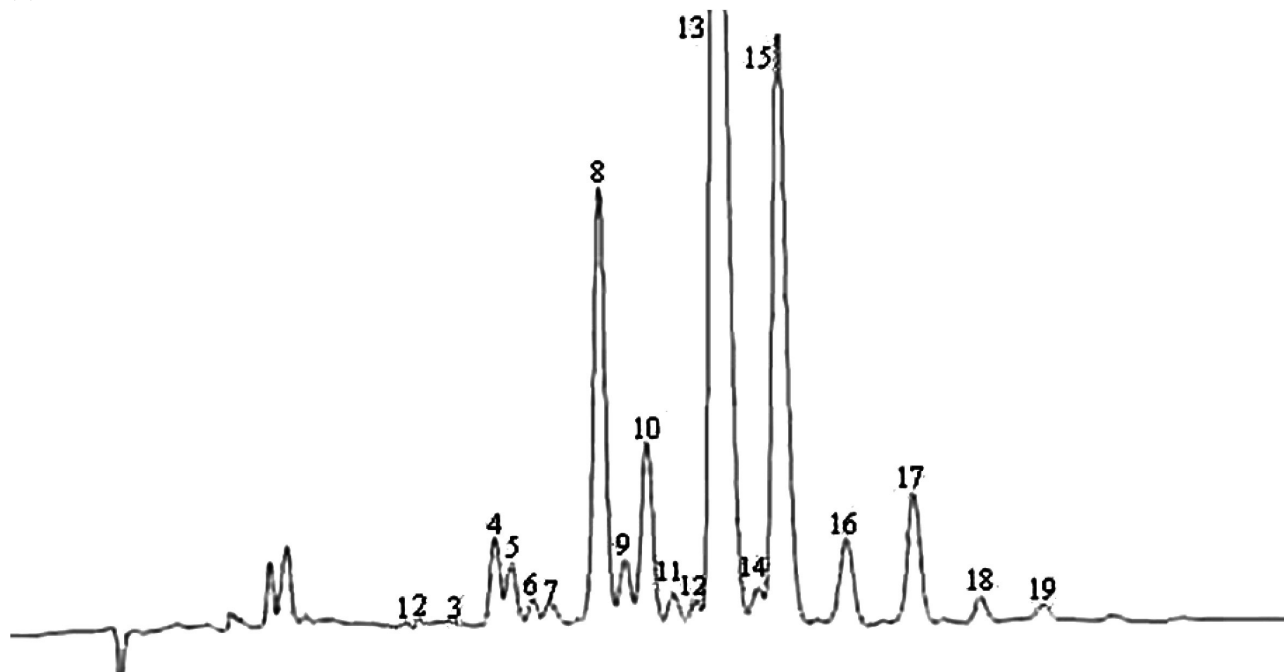
Оливкова олія з низьким вмістом лінолевої кислоти



Із розчинником: Ацетон/Ацетонітрил

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

(b)



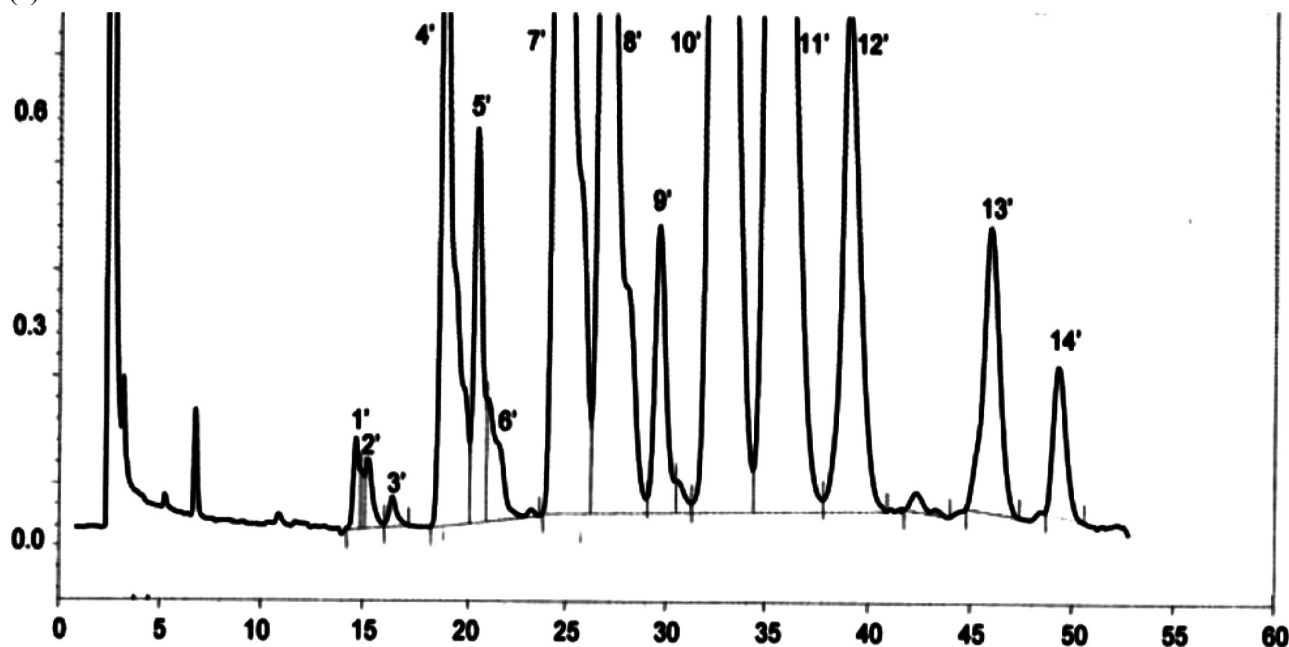
Із розчинником: Пропіонітрил

ПРОФІЛЬ b: Основні складові хроматографічних піків: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS.

Рисунок 3

Оливкова олія з високим вмістом лінолевої кислоти

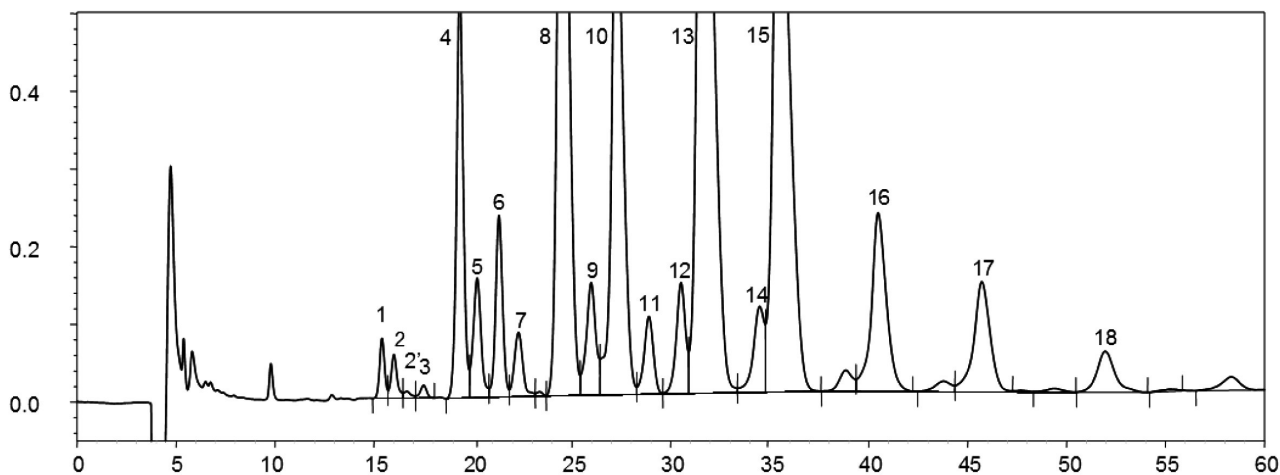
(a)



Із розчинником: Ацетон/Ацетонітрил (50:50).

Профіль a: Основні складові хроматографічних піків: **ECN42**: (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; **ECN44**: (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPOPo; **ECN46**: (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; **ECN48**: (10') OOO; (11') POO + SLL + PPOO; (12') POP + PLS; **ECN50**: (13') SOO; (14) POS + SLS.

(b)



Із розчинником: Пропіонітрил

Профіль b: Основні складові хроматографічних піків: **ECN42:** (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44:** (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; **ECN48:** (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50:** (17) SOO; (18) POS + SLS; **ECN52:** (19) AOO.

▼M32

ДОДАТОК XIX

ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДУ ТА ВМІСТУ СТЕРОЛУ ТА СПИРТОВИХ СПОЛУК ЗА ДОПОМОГОЮ КАПІЛЯРНОЇ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Цей метод описує процедуру визначення індивідуального і загального вмісту спиртових сполук в оливкових оліях та оливкових оліях з вичавок, а також сумішах цих двох олій.

Спиртові сполуки в оливковій олії та оливкової олії з вичавок містять аліфатичні спирти, стероли та тритерпенові діоли.

2. ПРИНЦИП

Олії з доданими α -холестанолом та 1-ейкозаноном як внутрішніми стандартами омилюють гідроксидом калію в етанольному розчині, а неомилювану речовину потім екстрагують етиловим ефіром.

Фракції різних спиртових сполук відділяють від неомилювальної речовини або тонкошаровою хроматографією на основній пластинці з силікагелем (еталонний метод), або за допомогою ВЕРХ з колонкою з силікагелем. Фракцію, відновлену з розділення силікагелю, трансформують у триметилсилілові ефіри, а потім аналізують за допомогою газової хроматографії на капілярній колонці.

ЧАСТИНА 1

ВИГОТОВЛЕННЯ НЕОМИЛЮВАНОЇ РЕЧОВИНИ

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Ця частина описує підготовку та екстрагування неомилюваної речовини. Вона включає підготовку та екстрагування неомилюваної речовини з оливкової олії та оливкової олії з вичавок.

2. ПРИНЦИП

Відібрану пробу омилюють шляхом кип'ятіння із зворотним потоком зі спиртовим розчином гідроксиду калію. Неомилювану речовину екстрагують діетиловим ефіром.

3. ПРИЛАДИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Звичайне лабораторне обладнання, зокрема:

- 3.1. Круглодонна колба з зворотним конденсатором зі з'єднаннями із притертого скла, 250 мл.
- 3.2. Ділильна лійка, 500 мл.
- 3.3. Колби, 250 мл.
- 3.4. Мікрошприци, 100 та 500 мкл.
- 3.5. Циліндрична фільтрувальна лійка з пористою вкладкою G3 (пористість від 15–40 мкм) діаметром близько 2 см і глибиною приблизно 5 см, що дозволяє фільтрацію під вакуумом, і шліфом із зовнішньою різьбою.
- 3.6. Конічна вакуумна колба зі з'єднанням з внутрішньою різьбою, 50 мл, яка може бути приєднана до фільтрувальної лійки (див. п. 3.5).
- 3.7. Тестова пробірка зі конічним дном та герметичною скляною пробкою, 10 мл.
- 3.8. Ексикатор дихлориду кальцію.

4. РЕАГЕНТИ

- 4.1. Гідроксид калію, мінімальний титр — 85 %.
- 4.2. Етаноловий розчин гідроксиду калію, близько 2 М.

Розчинити 130 г гідроксиду калію (4.1) з охолодженням у 200 мл дистильованої води та розвести етанолом до одного літра (4.7). Зберігати розчин в щільно закритих пляшках з темного скла максимум впродовж двох днів.

- 4.3. Етиловий ефір, якість для аналізу.
- 4.4. Безводний сульфат натрію, якість для аналізу.
- 4.5. Ацетон, якість для хроматографії.
- 4.6. Етиловий ефір, якість для хроматографії.
- 4.7. Етанол, якість для аналізу.
- 4.8. Етилацетат, якість для аналізу.
- 4.9. Внутрішній стандарт, α -холестанол, чистота більше 99 % (чистоту необхідно перевірити за допомогою газохроматографічного аналізу).
- 4.10. Розчин α -холестанолу, внутрішній стандарт, 0,2 розчин (м/об) в етилацетаті (4.8).
- 4.11. Розчин фенолфталеїну, 10 г/л в етанолі (4.7).
- 4.12. 0,1 % (м/об) розчин 1-ейкозанолю в етилацетаті (внутрішній стандарт).

5. ПРОЦЕДУРА

Використовуючи мікрошприц на 500 мкл (3.4) ввести в 250 мл колбу (3.1) певний об'єм розчину α -холестанолу внутрішнього стандарту (4.10) та об'єм 1-ейкозанолю (4.12), що містить кількість холестеролу та ейкозанолю, яка відповідає приблизно 10 % вмісту стеролу та спирту в зразку. Наприклад, до 5 г зразку оливкової олії додати 500 мкл розчину α -холестанолу (4.10) та 250 мкл розчину 1-ейкозанолю (4.12). Для оливкових олій з вичавок додати 1500 мкл розчину α -холестанолу (4.10) та 1-ейкозанолю (4.12). Випаровувати до висихання в слабкому потоці азоту на теплій водяній бані. Після охолодження колби зважити $5,00 \pm 0,01$ г сухого відфільтрованого зразка в ту саму колбу.

Примітка 1: Тваринні або рослинні олії та жири, що містять значні кількості холестеролу, можуть демонструвати пік із часом утримання, ідентичним холестеролу. Якщо це відбувається, фракцію стеролу необхідно аналізувати у двох примірниках із внутрішнім стандартом та без нього.

Додати 50 мл 2М етилового розчину гідроксиду калію (4.2) і деяку кількість пемзи, приєднати зворотний конденсатор та нагріти до легкого кипіння, аж поки не відбудеться омилення (розчин стане прозорим). Продовжувати нагрівати ще 20 хвилин, потім додати 50 мл дистильованої води з верхньої частини конденсатора, від'єднати конденсатор і охолодити колбу приблизно до 30 °С.

Перемістити вміст колби за кількістю в ділильну лійку об'ємом 500 мл (3.2), використовуючи кілька порцій дистильованої води (50 мл). Додати приблизно 80 мл етилового ефіру (4.6), інтенсивно збовтати протягом приблизно 60 секунд, періодично звільняючи тиск, перевертаючи ділильну лійку і відкриваючи кран. Дати постояти до повного розділення двох фаз (Примітка 2). Потім якомога ретельніше випустити мильний розчин у другу ділильну лійку. Виконати ще два екстрагування на водно-спиртовій фазі, таким же чином, використовуючи 60-70 мл етилового ефіру (пункт 4.6).

Примітка 2: Будь-яка емульсія може бути зруйнована шляхом додавання невеликої кількості етанолу (4.7).

Об'єднати три ефірні екстракти в одній ділильній лійці, що містить 50 мл води. Продовжувати промивати водою (50 мл), поки вода для промивання більше не набуватиме рожевого кольору при додаванні краплі розчину фенолфталеїну (4.11). Коли вода для промивання буде видалена, відфільтрувати через безводний сульфат натрію (4.4) в попередньо зважену колбу ємністю 250 мл, омиваючи лійку та фільтр невеликою кількістю етилового ефіру (4.6).

Випарувати розчинник шляхом дистилування в ротаційному випарнику у вакуумі при 30 °С. Додати 5 мл ацетону (4.5) та повністю видалити леткий розчинник легким потоком азоту. Висушити залишок у печі при 103 ± 2 °С упродовж 15 хв. Охолодити в ексікаторі та зважити з точністю до 0,1 мг.

ЧАСТИНА 2

РОЗДІЛЕННЯ ФРАКЦІЙ СПИРТОВИХ СПОЛУК

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Неомілювана речовина, приготована у частині 1, фракціонується в різних спиртових сполуках, аліфатичних спиртах, стеролах та тритерпенових діолах (еритродіолі та уваолі).

2. ПРИНЦИП

Неомілювана речовина може бути фракціонована за допомогою методу основної тонкошарової хроматографії (референтний метод), виявлена, а відповідні смужки – відбраковані та видалені. Як альтернативний метод розділення, ВЕРХ з використанням колонки з силікагелем та УФ-детектор, а також збирання різних фракцій. Аліфатичні та тритерпенові спирти, а також стерол та тритерпенові діоли ізолюють разом.

3. ПРИЛАДИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Звичайне лабораторне обладнання, зокрема:

- 3.1. Усі прилади і обладнання для аналізу методом тонкошарової хроматографії з використанням скляних пластин 20 x 20 см.
- 3.2. Ультрафіолетова лампа з довжиною хвиль 366 або 254 нм.
- 3.3. Мікрошприци, 100 та 500 мкл.
- 3.4. Циліндрична фільтрувальна лійка з пористою вкладкою G3 (пористість від 15-40 мкм) діаметром близько 2 см і глибиною приблизно 5 см, що дозволяє фільтрацію під вакуумом, і шліфом із зовнішньою різьбою.
- 3.5. Конічна вакуумна колба зі з'єднанням з внутрішньою різьбою, 50 мл, яка може бути приєднана до фільтрувальної лійки (див. п. 3.4).
- 3.6. Тестова пробірка зі конічним дном та герметичною скляною пробкою об'ємом 10 мл.
- 3.7. Ексікатор дихлориду кальцію.
- 3.8. Система ВЕРХ, що складається з:
 - 3.8.1. Бінарного насоса.
 - 3.8.2. Ручного або автоматичного інжектора, оснащеного петлею для введення 200 мкл.
 - 3.8.3. Лінійний дегазатор.
 - 3.8.4. Детектор УФ у видимій частині спектра або ІЧ
- 3.9. Колонка ВЕРХ (25 см × 4 мм внутрішній діаметр) із силікагелем 60 (розмір частинки 5 мкм).

- 3.10. Шприцевий фільтр, 0,45 мкм.
- 3.11. Конічна колба об'ємом 25 мл.

4. РЕАГЕНТИ

- 4.1. Гідроксид калію, мінімальний титр — 85 %.
- 4.2. Етаноловий розчин гідроксиду калію, близько 2 М.

Розчинити 130 г гідроксиду калію (4.1) з охолодженням у 200 мл дистильованої води, а потім розвести етанолом до одного літра (4.9). Зберігати розчин в щільно закритих пляшках з темного скла максимум впродовж двох днів.

- 4.3. Етиловий ефір, якість для аналізу.
- 4.4. Етаноловий розчин гідроксиду калію, близько 0,2 М.

Розчинити 13 г гідроксиду калію (4.1) в 20 мл дистильованої води та розвести етанолом до одного літра (4.9).

- 4.5. Скляні пластини 20x20, вкриті силікагелем, без індикатора флуоресценції, товщиною — 0,25 мм (готові до використання доступні у продажу).
- 4.6. Ацетон, якість для хроматографії.
- 4.7. n-гексан, якість для хроматографії.
- 4.8. Етиловий ефір, якість для хроматографії.
- 4.9. Етанол, аналітична чистота.
- 4.10. Етилацетат, аналітична чистота.
- 4.11. Референтний розчин для тонкошарової хроматографії: холестерол, фітостероли, спирти і 5 % розчин еритродіолу в етилацетаті (4.10).
- 4.12. Розчин 2,7-дихлорфлуоресцеїну, 0,2 % в етаноловому розчині. Зробити легку основу, додавши кілька крапель 2 М спиртового розчину гідроксиду калію (4.2).
- 4.13. Суміш n-гексану (4.7)/етилового ефіру (4.8) суміш 65:35 (об/об).
- 4.14. ВЕРХ рухомої фази n-гексану (4.7)/ етилового ефіру (4.8) (1:1) (об/об).

5. РЕФЕРЕНТНИЙ МЕТОД: РОЗДІЛЕННЯ СПИРТОВИХ СПОЛУК БАЗОВИМИ ТОНКОШАРОВИМИ ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ ПЛАСТИНАМИ (ТШХ)

Підготування базових пластин для тонкошарової хроматографії. Занурити пластини з силікагелем (4.5) приблизно на 4 см у 0,2 М етанолового розчину гідроксиду калію (4.4) на 10 секунд, потім дати просохнути у витяжній шафі протягом двох годин і нарешті помістити в піч при 100 °С на одну годину.

Вийняти з печі і помістити в ексікатор з хлоридом кальцію (3.7), доки не виникне потреба використання (пластини, оброблені таким способом, необхідно використати протягом 15 днів).

Помістити суміш гексану/етилового ефіру (4.13) (Примітка 3) в камеру для проявлення на глибину приблизно 1 см. Закрити камеру відповідною кришкою та залишити в такому стані щонайменше на півгодини у прохолодному місці, щоб встановити рівновагу між рідиною і паром. Смужки фільтрувального паперу, що занурюються в елюент, можна розмістити на внутрішніх поверхнях камери. Це скорочує час обробки приблизно на третину і забезпечує більш рівномірне та регулярне елюювання компонентів.

Примітка 3: Проявну суміш потрібно замінювати для кожного випробування, щоб досягти ідеально відтворених умов елюювання. Як альтернативу можна використовувати розчинник 50:50 (об/об) з n-гексану/етилового ефіру.

Приготувати приблизно 5 % розчин неомилуваної фракції, підготовлений в етилацетаті, отриманому відповідно до частини 1 (4.10) та, використовуючи мікрошприц на 100 мкл (3.3), помістити 0,3 мл розчину у формі вузької рівномірної смужки на нижньому кінці (2 см) хроматографічної пластини (4.5). На одній лінії зі

смужкою помістити від 2 до 3 мкл референтного розчину (4.11), щоб діапазони стеролів, тритерпенових діолів та спиртів могли бути ідентифіковані після проявлення.

Помістити пластину в камеру для проявлення (3.1). Температура навколишнього середовища повинна становити від 15 до 20 °С (Примітка 4). негайно закрити камеру кришкою та дозволити елюювання, доки рівень розчинника не досягне близько 1 см від верхнього краю пластини. Вийняти пластину з камери для проявлення та випарувати розчинник потоком гарячого повітря або залишити пластину на короткий проміжок часу під кришкою.

Примітка 4: Вища температура може погіршити розділення.

Легко та рівномірно розбризкати на пластину розчин 2,7-дихлорофлуоресцеїну (4.12) та залишити висихати. Коли за пластину спостерігають під ультрафіолетовою лампою (3.2), смуги стеролів, тритерпенових діолів та спиртів можуть бути ідентифіковані шляхом зіставлення з плямами, отриманими за допомогою референтного розчину (4.11). Позначити чорним олівцем межі смужок вздовж країв флюоресценції (див. рисунок 1, пластина для ТШХ).

Використовуючи металевий шпатель, зішкребти силікагель з позначеної площі. Помістити добре подрібнений матеріал до фільтрувальної лійки (3.4). Додати 10 мл гарячого етилацетату (4.10), ретельно перемішати металевим шпателем і відфільтрувати (якщо необхідно, у вакуумі), збираючи фільтрат у конічну колбу (3.5.), приєднану до воронки фільтра.

Тричі промити осад у колбі етиловим ефіром (4.3) (кожного разу близько 10 мл), збираючи фільтрат у ту ж колбу, приєднану до лійки, випарувати фільтрат до об'єму 4-5 мл, перемістити залишковий розчин до попередньо зваженої 10 мл тестової пробірки (3.6), випарувати до сухого стану повільним нагріванням під легким струменем азоту, розбавити ще раз, використовуючи кілька крапель ацетону (4.6), повторно випарувати до сухого стану. Залишок, що міститься в тестовій пробірці, складається з фракцій стеролу і тритерпенових діолів або фракцій спиртів і тритерпенових спиртів.

6. РОЗДІЛЕННЯ СПИРТОВОЇ ФРАКЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ ВЕРХ

Неомілювану речовину, отриману відповідно до частини 1, розчинити у 3 мл рухомої фази (4.14), відфільтрувати розчин шприцевим фільтром (3.10) і залишити.

До ВЕРХ ввести 200 мкл відфільтрованого неомілюваного розчину (3.8).

Запустити розділення за допомогою методу ВЕРХ при 0,8 мл/хв, не враховувати перші 5 хв, і зібрати у конічні колби 25 мл (3.11) в проміжок часу між 5 та 10 хв для аліфатичних та тритерпенових спиртів та від 11 до 25 хв для стеролів та еритродіолу і уваолу (Примітка 5).

Розділення можна моніторити за допомогою УФ-детектора при довжині хвилі 210 нм або детектора показника заломлення (див. рисунок 6).

Фракції випарувати до сухості і підготувати для хроматографічного аналізу.

Примітка 5: Ретельно контролювати тиск насоса при використанні методу ВЕРХ, етиловий ефір може підвищити тиск, відрегулювати потік, щоб тримати тиск під контролем.

ЧАСТИНА 3

ГАЗОВИЙ ХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ ФРАКЦІЙ СПИРТОВИХ СПОЛУК

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

У цій частині представлені загальні настанови для застосування газової хроматографії з використанням капілярної колонки для визначення якісного та кількісного складу спиртових сполук, виділених у відповідності з методом, зазначеним у частині 2 цього методу.

2. ПРИНЦИП

Фракції, зібрані з неомілюваної речовини за допомогою ТШХ або ВЕРХ, дериватизують у триметилсилілові ефіри та аналізують за допомогою газової хроматографії на капілярній колонці з розділенням введенням та полум'яно-іонізаційним детектором.

3. ПРИЛАДИ ТА ОБЛАДНАННЯ

Звичайне лабораторне обладнання, зокрема:

- 3.1. Тестова пробірка з конічним дном та герметичною скляною пробкою на 10 мл.
- 3.2. Газовий хроматограф, що підходить для використання з капілярною колонкою з системою роздільного введення, яка складається з:
 - 3.2.1. Термостатичної камери для колонок, що може підтримувати бажану температуру з точністю до ± 1 °C;
 - 3.2.2. Інжектор з функцією регулювання температури зі скляним випаровуючим елементом та системою розподілу;
 - 3.2.3. Полум'яно-іонізаційний детектор (ПД);
 - 3.2.4. Система отримання даних, що підходить для використання з ПД (3.10.3.), з можливістю ручного інтегрування.
- 3.3. Капілярна колонка з плавленого кварцу довжиною 20-30 м, внутрішнім діаметром 0,25-0,32 мм, покрита 5 % дифеніл - 95 % диметилполісилоксаном (SE-52 або SE-54 нерухомої фази чи еквівалентом), до однорідної товщини 0,10-0,30 мкм.
- 3.4. Мікрошприц ємністю 10 мкл для газової хроматографії, з впаяною голкою, що підходить для роздільного введення.

4. РЕАГЕНТИ

- 4.1. Безводний піридин, якість для хроматографії.
- 4.2. Гексаметилдисилазан аналітичної якості.
- 4.3. Триметилхлоросилан аналітичної якості.
- 4.4. Зразки розчинів стерол триметилсилілових ефірів. Їх готують під час використання зі стеролів та еритродіолу, отриманих з олій, що їх містять.
- 4.5. Стандартні розчини триметилсилілових ефірів аліфатичних спиртів з C20 до C28. Їх можна приготувати з сумішей чистих спиртів у той час, коли вони необхідні для використання.
- 4.6. Газ-носії: водень або гелій, чистота для газової хроматографії.
- 4.7. Допоміжні гази: водень, гелій, азот та повітря, чистота для газової хроматографії.
- 4.8. Реагент для силілування, що складається з суміші 9:3:1 (об/об/об) піридин/гексаметилдисилазан/триметилхлоросилан.
- 4.9. n-гексан, якість для хроматографії.

5. ПРИГОТУВАННЯ ТРИМЕТИЛСИЛІЛОВИХ ЕФІРІВ

Додають реагент для силілування (4.8) (Примітка 6) у співвідношенні 50 мкл на кожен міліграм спиртової сполуки у тестовій пробірці (3.1), яка містить фракцію спиртової сполуки, уникаючи потрапляння вологи (Примітка 7).

Примітка 6: Розчини, які готові для застосування, доступні в продажу. Також доступні інші реагенти для силілування, такі як, наприклад, бістріметилсилілтрифторацетамід + 1 % триметилхлоросилан, які повинні бути розведені таким самим об'ємом безводного піридину. Піридин можна замінити такою ж кількістю ацетонітрилу.

Примітка 7: Незначна опалесценція, яка може виникнути, є нормальним явищем і не призведе до жодної аномалії. Утворення білого осаду або поява рожевого забарвлення вказують на присутність вологи або псування реагенту. Якщо це відбулось, випробування необхідно повторити (тільки якщо використовують гексаметилдисилазан/триметилхлоросилан).

Закрити пробкою тестову пробірку (3.1), акуратно збовтати (без перевертання), доки сполуки повністю не розчиняться. Залишити настоятися впродовж щонайменше 15 хвилин за температури навколишнього

середовища, а потім центрифугувати впродовж кількох хвилин. Прозорий розчин готовий до газохроматографічного аналізу.

6. ГАЗОВИЙ ХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ

6.1. Попередні операції, кондиціонування капілярної колонки

Встановити колонку (3.3) в газовий хроматограф, приєднавши вхідний отвір до роздільного інжектора, а вихідний отвір — до детектора.

Провести загальні перевірки системи газового хроматографа (витоки з газових контурів, ефективність детектора, ефективність розділювальної системи та системи реєстрації тощо).

Якщо колонку використовують вперше, рекомендовано привести її у робочий стан: пропустити легкий струмінь газу через саму колонку, потім увімкнути газовий хроматограф та почати поступове нагрівання до температури щонайменше на 20 °C більшої ніж робоча температура (примітка 8). Підтримувати цю температуру щонайменше впродовж двох годин, потім перевести всю систему в робочий режим (налаштування потоків газу та розділення, запалювання полум'я, приєднання до комп'ютерної системи, налаштування температури колонки, детектора, інжектора, тощо) і потім записати сигнал з чутливістю щонайменше вдвічі вищою ніж необхідно для аналізу. Курс базової лінії повинен бути лінійним, без піків будь-якого походження, і не повинен зміщуватися. Негативне зміщення прямої вказує на витік у з'єднаннях колонки; позитивне зміщення прямої вказує на те, що колонку неправильно приведено в робочий стан.

Примітка 8: Температура приведення в робочий стан має бути щонайменше на 20 °C меншою ніж максимальна температура, зазначена для нерухомої фази.

6.2. Умови експлуатації

Оптимізувати температурну програму та потік газу-носія, щоб отримати хроматограми, подібні до тих, що показані на рисунках 3-6.

Наступні параметри були випробувані та визнані корисними:

6.2.1. Аліфатичні спирти

Програма печі	180 °C (8 хв.) → 260 °C (при 5 °C/хв) → 260 °C (15 хв)
Температура інжектора	280 °C
Температура детектора	290 °C
Лінійна швидкість газу-носія	Гелій (від 20 до 30 см/сек); водень (від 30 до 50 см/сек)
Коефіцієнт розділення	від 1:50 до 1:100
Введений об'єм	0,5-1 мкл розчину TMSE

6.2.2. Стерол і тритерпенові діоли

Програма печі	260 ± 5 °C, ізотермічний
Температура інжектора	280 – 300 °C
Температура детектора	280 – 300 °C
Лінійна швидкість газу-носія	Гелій (від 20 до 30 см/сек); водень (від 30 до 50 см/сек)
Коефіцієнт розділення	від 1:50 до 1:100
Введений об'єм	0,5-1 мкл розчину TMSE

Ці умови можна змінювати відповідно до характеристик колонки та газового хроматографа для того, щоб отримати хроматограми, що відповідають таким вимогам:

- Час утримання спирту C26 повинен складати 18 ± 5 хвилин.
- Пік спирту C22 повинен складати 80 ± 20 % повної шкали для оливкової олії і 40 ± 20 % повної шкали для оливкової олії з вичавок.
- Час утримання для піку β -ситостерину повинен становити 20 ± 5 хвилин.
- Пік кампестеролу має складати: для оливкової олії (середній вміст 3 %) 20 ± 5 % повної шкали.
- Усі наявні стероли необхідно розділити. Додатково до того, що піки розділені, вони також мають бути повністю відділені, тобто слід піку повинен повернутися до базової лінії, перш ніж перерости в наступний пік. Однак допускається неповне розділення, за умови, що пік при RRT 1,02 (Ситостанол) може бути визначений кількісно за допомогою перпендикуляра.

6.3. Процедура аналізу

Використовуючи мікрошприц 10 мкл (3.4), набрати 1 мкл гексану, набрати 0,5 мкл повітря, а потім 0,5-1 мкл розчину зразка. Підняти поршень шприца вище, щоб спорожнити голку. Проколоти голкою мембрану інжектора і після однієї-двох секунд швидко ввести речовину, потім повільно вийняти голку через приблизно п'ять секунд. Також можна використовувати автоматичний інжектор.

Продовжувати запис до тих пір, поки TMSE присутніх відповідних спиртових сполук повністю елююється. Базова лінія повинна надалі відповідати вимогам відповідних робочих умов (6.2.1 або 6.2.2).

6.4. Визначення піків

Визначають окремі піки на основі часу утримання і шляхом порівняння з сумішами аліфатичних та тритерпенових спиртів або стеролу та тритерпенових діолів TMSE, проаналізованих за тих самих умов. Хроматограма фракції аліфатичних та тритерпенових спиртів показана на рисунку 3, а відповідні хроматограми для стеролів та тритерпенових діалкоголів показані на рисунку 2.

Аліфатичні спирти елюються в наступному порядку: C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol and C28-ol.

Стероли та тритерпенові діоли елюються у такому порядку: холестерол, брасикастерол, ергостерол, 24-метилен-холестерол, кампестерол, кампестанол, стигмастерол, Δ^7 -кампестерол, $\Delta^5,23$ -стигмастадієнол, клеростерол, β -сістостерол, ситостанол, Δ^5 -авенастерол, $\Delta^5,24$ -стигмастадієнол, Δ^7 -стигмастенол, Δ^7 -авенастерол, еритродіол і уваол.

6.5. Кількісне оцінювання

Площі піків 1-ейкозанолу та аліфатичних спиртів C22, C24, C26, C28 обчислюються системою збору даних. Коефіцієнт чутливості до 1-ейкозанолу слід вважати рівним 1.

Розрахувати площі піків α -холестанолу, стеролу та тритерпенових діолів, використовуючи комп'ютерну систему. Ігнорувати піки будь-яких сполук, не включених до списку, наведеного в таблиці 1 (розрахувати ергостерол не потрібно). Коефіцієнт чутливості для α -холестанолу слід вважати рівним 1.

Розрахувати концентрацію кожної окремої спиртової сполуки в мг/кг жирового матеріалу таким чином:

$$\text{Alcoholic compound } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1000$$

де:

- A_x = Площа піку спиртової сполуки x, в пунктах обчислювальної системи.
- A_s = Площа піку 1-ейкозанолу/ α -холестанолу, в пунктах обчислювальної системи.
- m_s = Маса доданого 1-ейкозанолу/ α -холестанолу, в міліграмах.
- m = Маса зразка, використаного для визначення, в грамах.

7. ВИРАЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Вказують індивідуальні концентрації аліфатичних та тритерпенових спиртів в мг/кг жирового матеріалу, а їхню суму як «загальний вміст аліфатичних спиртів». Загальний вміст – це сума C22, C24, C26 і C28.

Склад кожної з окремих спиртових сполук повинен бути виражений з точністю до одного знаку після коми.

Загальна концентрація стеролу повинна бути виражена без знаків після коми.

Розрахувати відсоток кожного окремого стеролу зі співвідношення відповідної площі піку до усїєї площі піків для стеролів:

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

де:

A_x = Площа піку для стеролу x.

ΣA = Уся площа піку для стеролів.

Наявний β -ситостерол: $\Delta 5,23$ - стигмастадієнол + клеростерол + β -ситостерол + ситостанол + $\Delta 5$ -авенастерол + $\Delta 5,24$ - стигмастадієнол.

Розрахувати відсоток еритродіолу та уваолу:

$$\text{Erythrodiol} + \text{Uvaol} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

де:

A_{Er} = Площа еритродіолу в пунктах обчислювальної системи.

A_{Uv} = Площа уваолу в пунктах обчислювальної системи.

ΣA_T = Сума площі стеролу + еритродіолу + уваолу в пунктах обчислювальної системи.

Окрім розрахунку відносного відсотка одиничних стеролів та тритерпенових діалкоголів та загальної концентрації стеролів, необхідно розрахувати концентрації еритродіолу та уваолу та їх суму в мг/кг жирного матеріалу згідно з наступними виразами:

$$\text{Erythrodiol} = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1000$$

$$\text{Uvaol} = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1000$$

де:

A_{Er} = Площа піку еритродіолу в пунктах обчислювальної системи.

A_{Uv} = Площа уваолу в пунктах обчислювальної системи.

A_s = Площа піку α -холестанолу, в пунктах обчислювальної системи.

m_s = Маса доданого α -холестанолу, в міліграмах.

m = Маса зразка, використаного для визначення, в грамах.

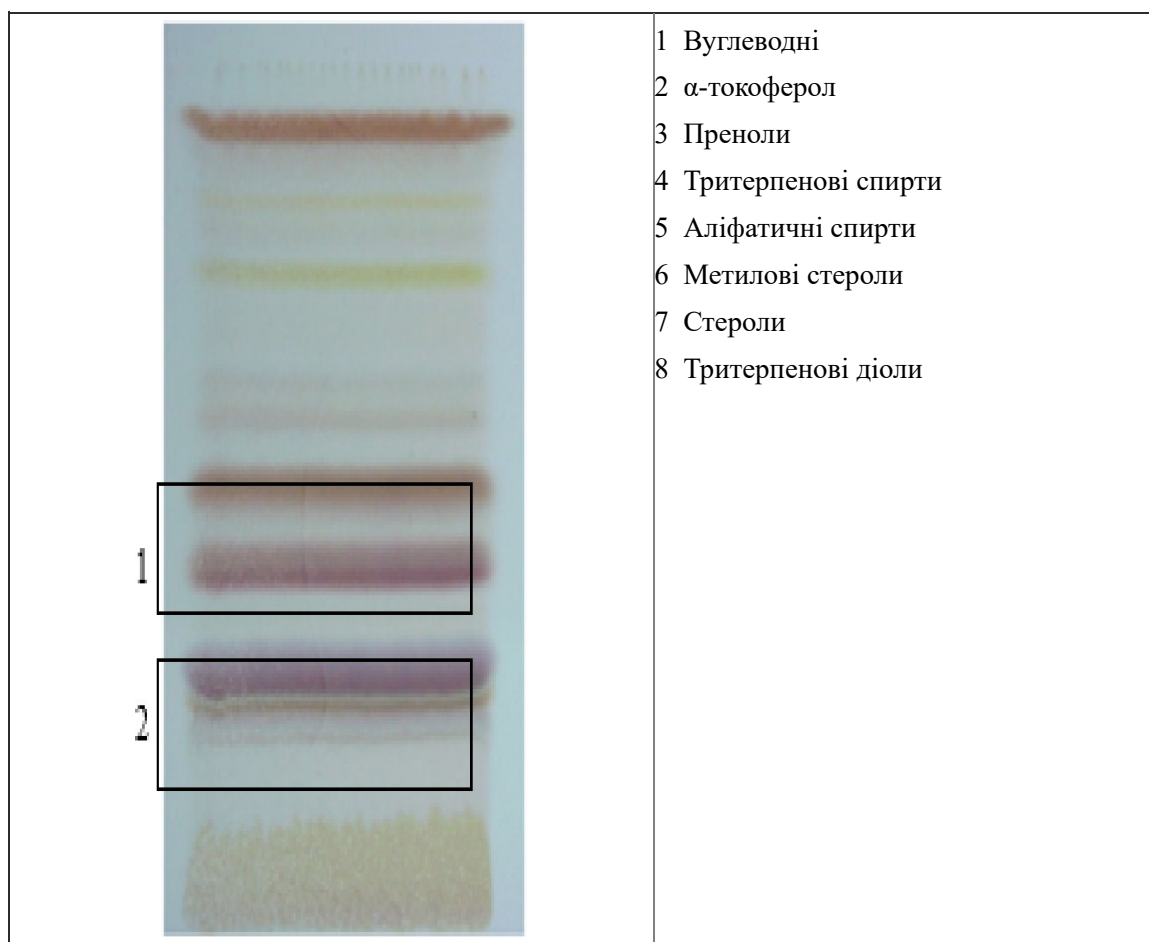


Рисунок 1 — ТШХ неомилуваної фракції олії з оливкових вичавок двічі елюювали гексаном: діетиловим ефіром (65:35), проявлювали SO_4H_2 (50 %) і нагрівали. Слід відбракувати смужки, що містяться у прямокутнику, 1 – смужки для аліфатичних спиртів та 2 – для стеролів та тритерпенових діалкоголів.

Таблиця I — Відносний час утримання для стеролів

Пік	Ідентифікація		Відносний час утримання	
			Колонка SE 54	Колонка SE 52
1	Холестерол	Δ -5-холестен-3 β -ол	0,67	0,63
2	Холестанол	5 α -холестан-3 β -ол	0,68	0,64
3	Брасикастерол	[24S]-24-метил- Δ -5,22-холестадиєнол-3 β -ол	0,73	0,71
*	Ергостерол	[24S]-24-метил- Δ -5-7-22 холестатриєн-3 β -ол	0,78	0,76
4	24-метилен-холестерол	24-метилен- Δ -5,24-холестадиєн-3 β -ол	0,82	0,80
5	Кампестерол	(24R)-24-метил- Δ -5-холестен-3 β - ол	0,83	0,81
6	Кампестанол	(24R)-24-метил-холестан-3 β -ол	0,85	0,82
7	Стигмастерол	(24S)-24-етил- Δ -5,22-холестадиєн-3 β -ол	0,88	0,87

8	Δ -7-кампестерол	(24R)-24-метил- Δ -7-холестен-3 β -ол	0,93	0,92
9	Δ -5,23-стигмастадієнол	(24R,S)-24-етил- Δ -5,23-холестадієн-3 β -ол	0,95	0,95
10	Клеростерол	(24S)-24-етил- Δ -5,25-холестадієн-3 β -ол	0,96	0,96
11	β -ситостерол	(24R)-24-етил- Δ -5-холестен-3 β -ол	1,00	1,00
12	Ситостанол	24-етил-холестан-3 β -ол	1,02	1,02
13	Δ -5-авенастерол	(24Z)-24-етиліден- Δ -холестен-3 β -ол	1,03	1,03
14	Δ -5-24-стигмастадієнол	(24R,S)-24-етил- Δ -5,24-холестадієн-3 β -ол	1,08	1,08
15	Δ -7-стигмастенол	(24R,S)-24-етил- Δ -7-холестен-3 β -ол	1,12	1,12
16	Δ -7-авенастерол	(24Z)-24-етиліден- Δ -7-холестен-3 β -ол	1,16	1,16
17	Еритродіол	5 α -олеан-12ен-3 β ,28-діол	1,41	1,41
18	Уваол	Δ 12-урсен-3 β ,28-діол	1,52	1,52

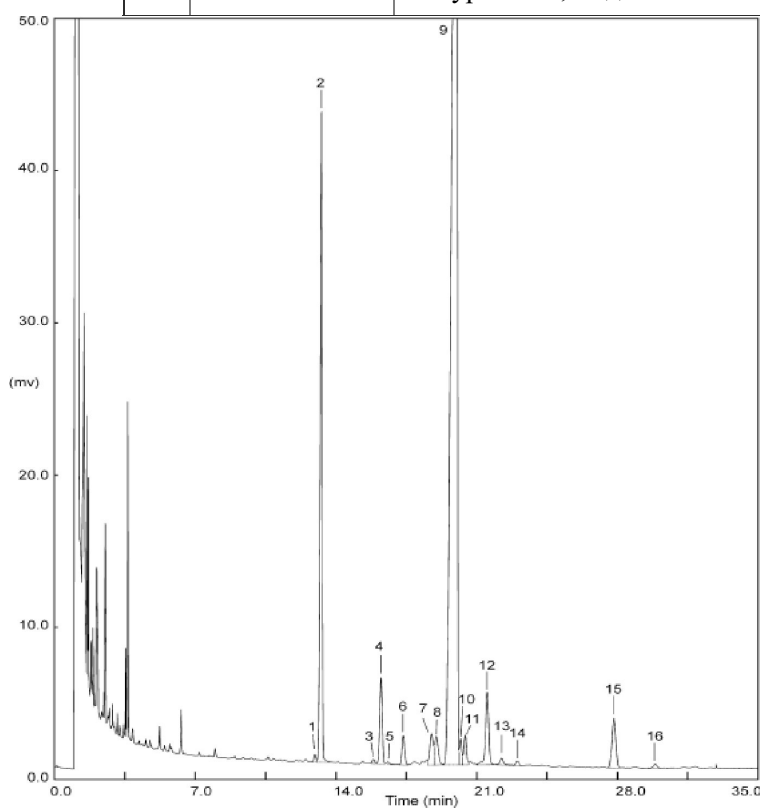


Рисунок 2 — Хроматографічний профіль ГХ-ПДД стеролу та тритерпенових діолів із рафінованої оливкової олії. (1) Холестерол, (2) α -холестанол (I.S.), (3) 24-метиленхолестерол, (4) кампестерол, (5) кампестанол, (6) стигмастерол, (7) Δ 5,23-стигмастадієнол, (8) клеростерол, (9) β -ситостерол, (10) ситостанол, (11) Δ 5-авенастерол, (12) Δ 5,24-стигмастадієнол, (13) Δ 7-стигмастенол, (14) Δ 7-авенастерол, (15) еритродіол, (16) уваол.

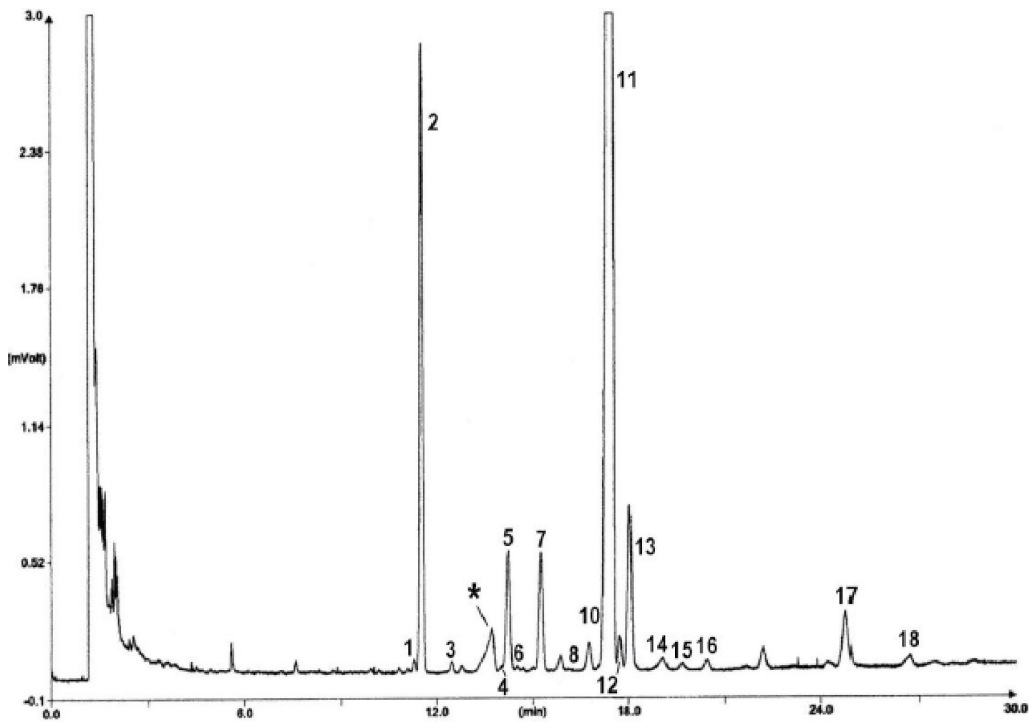


Рисунок 3 — Хроматографічний профіль ГХ-ПД стеролу та тритерпенових діалкоголів із лампової оливкової олії. (1) Холестерол, (2) α -холестанол, (3) брасикастерол, (4) 24-метилхлестерол, (5) кампестерол, (6) кампестанол, (7) стигмастерол, (8) Δ^7 -кампестерол, (9) $\Delta^{5,23}$ -стигмастадієнол, (10) клеростерол, (11) β -ситостерол, (12) ситостанол, (13) Δ^5 -авенастерол, (14) $\Delta^{5,24}$ -стигмастадієнол, (15) Δ^7 -стигмастенол, (16) Δ^7 -авенастерол, (17) еритродіол, (18) уваол.

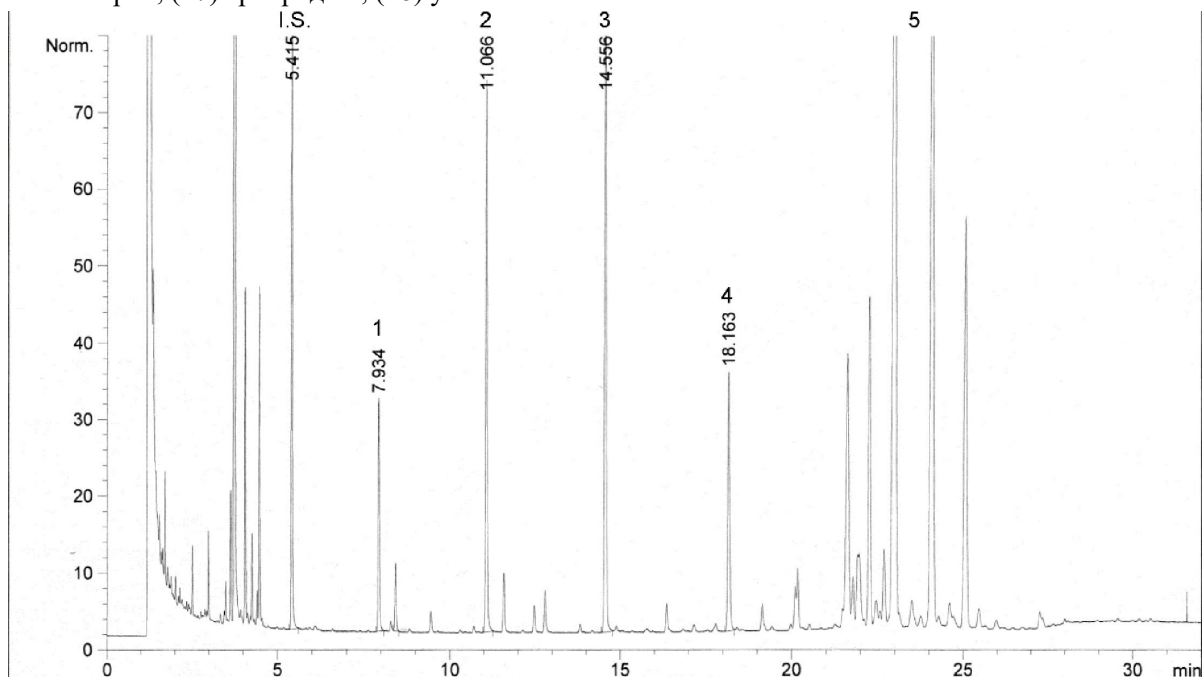


Рисунок 4 — Хроматографічний профіль ГХ-ПД аліфатичних спиртів та тритерпенових спиртів із оливкової олії. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) тритерпенові спирти.

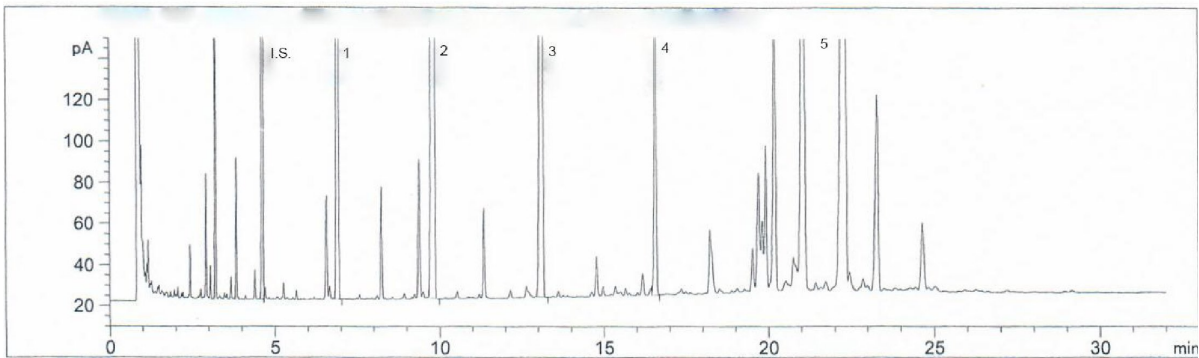
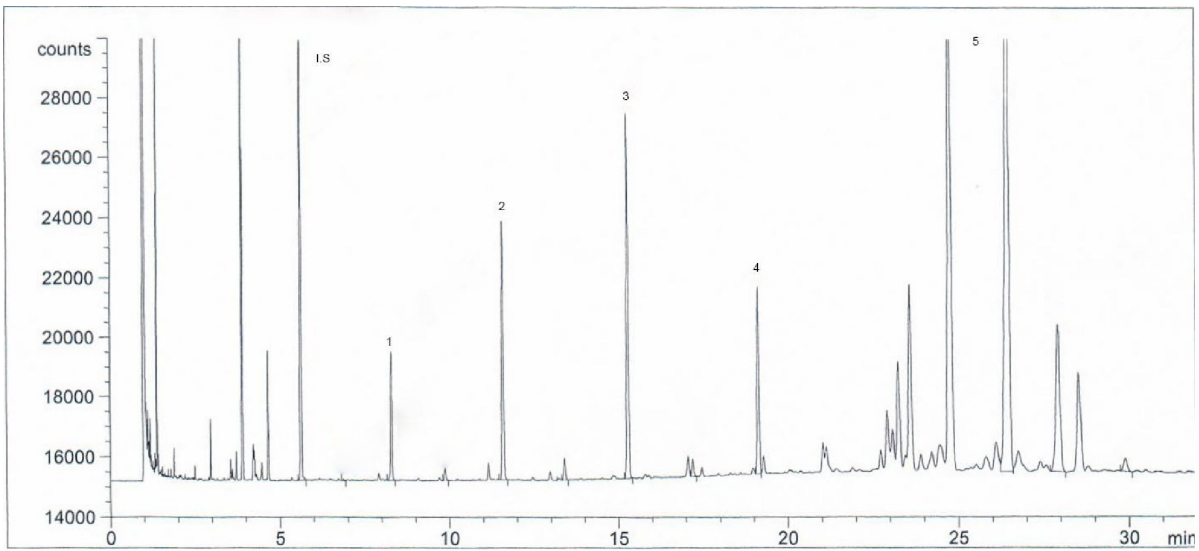


Рисунок 5 — Хроматографічний профіль ГХ-ПІД аліфатичних спиртів та тритерпенових спиртів рафінованої оливкової олії і оливкової олії другого центрифугування. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) тритерпенові спирти.

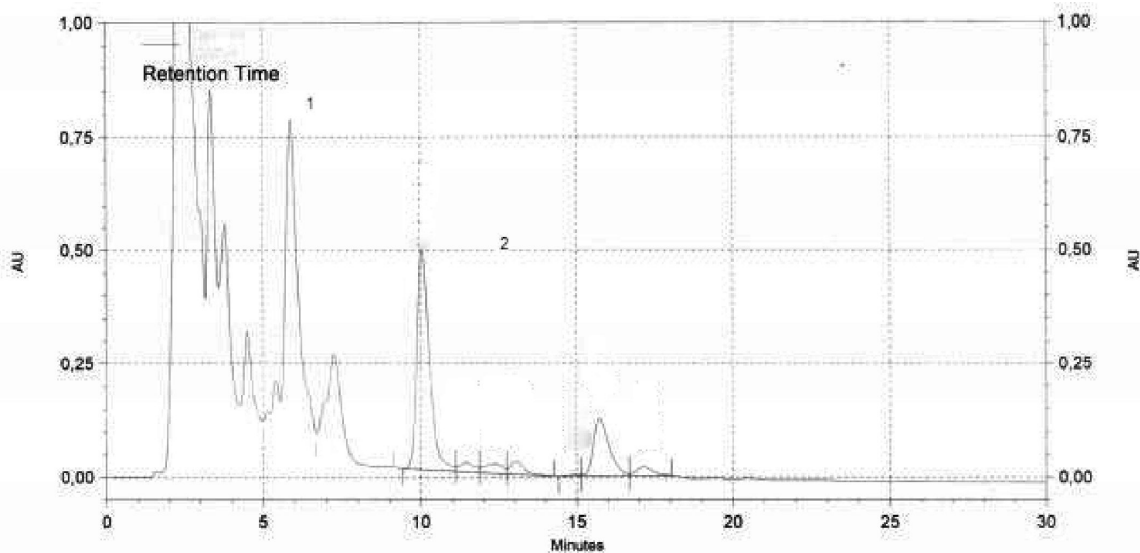


Рисунок 6 — Хроматограма ВЕРХ неомильованої оливкової олії розділеної за методом ВЕРХ за допомогою УФ-детектора. (1) Аліфатичні та тритерпенові алкоholes; (2) Стероли та тритерпенові діалкоholes.

▼ M23

Додаток XX

Метод визначення вмісту восків, метилових ефірів жирних кислот та етилових ефірів жирних кислот за допомогою капілярної газової хроматографії

1. МЕТА

Цей метод призначений для визначення вмісту восків, метилових та етилових ефірів жирних кислот в оливкових оліях. Окремі воски та алкілові ефіри розділяють відповідно до кількості атомів вуглецю. Цей метод рекомендується в якості інструменту для розрізнення оливкової олії і оливкової олії з вичавок та є параметром якості нерафінованої оливкової олії холодного пресування першого віджиму екстра класу, що дозволяє виявляти фальсифіковані суміші оливкової олії холодного пресування першого віджиму екстра класу з оліями нижчої якості, як то оливкова олія холодного пресування першого віджиму, лампова оливкова олія чи інші дезодоровані олії.

2. ПРИНЦИП

Додавання відповідних внутрішніх стандартів до олії і фракціонування хроматографією на колонці гідратованого силікагелю. Відновлення фракції, що елююється в умовах випробування (з меншою полярністю, ніж у триацилгліцеролів), і прямий аналіз за допомогою капілярної газової хроматографії.

3. ПРИЛАДИ ТА ОБЛАДНАННЯ

3.1. **Колба Ерленмеєра, 25 мл.**

3.2. **Скляна колонка** для рідинної хроматографії, внутрішній діаметр 15 мм, довжина — від 30 до 40 см, обладнана відповідним краном.

3.3. **Газовий хроматограф**, придатний для використання з капілярною колонкою, оснащений системою прямого введення на колонці, що включає:

3.3.1. **Піч, що регулюється термостатом, з температурним програмуванням.**

3.3.2. **Інжектор холодного пуску** для прямого введення на колонці

3.3.3. **Полум'яно-іонізаційний детектор та конвертер-підсилювач.**

3.3.4. **Інтегратор з функцією запису** (Примітка 1) для використання з конвертером-підсилювачем (пункт 3.3.3), з часом реагування не більше 1 с та змінною швидкістю паперу.

Примітка 1: Комп'ютеризовані системи також можна використовувати там, де дані газової хроматографії вводяться через ПК.

3.3.5. **Капілярна колонка, розплавлений кварц (для аналізу восків та метилових і етилових ефірів)**, довжина 8-12 м, внутрішній діаметр 0,25-0,32 мм, зсередини покриті рідкою фазою (примітка 2) до рівномірної товщини 0,10-0,30 мкм.

Примітка 2: Для цієї мети доступні в продажу готові відповідні рідкі фази, такі як SE52, SE54 тощо.

3.4. **Мікрошприц, 10 мкл**, з посиленою голкою, для прямого введення на колонці.

3.5. **Електричний змішувач.**

3.6. **Ротаційний випарник.**

3.7. **Муфельна піч.**

3.8. **Аналітичні ваги** для зважування з точністю до $\pm 0,1$ мг

3.9. Звичайний лабораторний посуд.

4. РЕАГЕНТИ

4.1. **Силікагель, 60-200 мкм меш.** Помістити силікагель у муфельну піч за 500 °C щонайменше на 4 години. Дозволити охолонути і потім додати 2% води відносно кількості використаного силікагелю. Добре збовтати до стану гомогенізованої суспензії і зберігати в ексикаторі щонайменше впродовж 12 годин перед використанням.

▼ M32

4.2. n-гексан, клас хроматографії або ступінь залишку. Гексан можна замінити ізо-октаном (2,2,4-

триметилпентан для хроматографії) за умови досягнення порівнюваних значень точності. Розчинники з більш високою температурою кипіння, ніж n-гексан, випаровуються довше. Однак їм віддають перевагу через токсичність гексану. Чистота повинна перевірятися; наприклад, можна контролювати залишок після випаровування 100 мл розчинника.

УВАГА — Пари можуть спалахнути. Тримати подалі від джерел тепла, іскор або відкритого полум'я. Упевнитися, що пляшки завжди закриті належним чином. Забезпечити належне вентилування під час використання. Уникати накопичення випарів та усунути будь-який можливий ризик пожежі, наприклад нагрівачі або електричні прилади, виготовлені не з вогнетривкого матеріалу. Небезпечний для вдихання, тому що може спричинити ураження нервових клітин. Уникати вдихання парів. За необхідності використовувати відповідний дихальний апарат. Уникати контакту з очима та шкірою.

Ізо-октан – легкозаймиста рідина, яка представляє небезпеку пожежі. Межі вибуховості в повітрі становлять 1,1 % до 6,0 % (об'ємна частка). Він токсичний при ковтанні та вдиханні. Використовувати вентильовану витяжку в хорошому робочому стані для роботи з цим розчинником.

▼ M23

4.3. Етиловий ефір, хроматографічного класу

УВАГА — Легкозаймистий і помірно токсичний. Подразнює шкіру. Шкідливий при вдиханні. Може викликати пошкодження очей. Наслідки можуть бути відкладені. Може утворювати вибухонебезпечні пероксиди. Пари можуть спалахнути. Тримати подалі від джерел тепла, іскор або відкритого полум'я. Упевнитися, що пляшки завжди закриті належним чином. Забезпечити належне вентилування під час використання. Уникати накопичення випарів та усунути будь-який можливий ризик пожежі, наприклад нагрівачі або електричні прилади, виготовлені не з вогнетривкого матеріалу. Не випаровувати до сухості чи майже сухості. Додавання води або відповідного відновлювача може зменшити утворення пероксиду. Не пити. Уникати вдихання парів. Уникати довгого або тривалого контакту зі шкірою.

4.4. n-гептан, хроматографічного класу, або ізооктан

УВАГА — Легкозаймистий. Шкідливий при вдиханні. Тримати подалі від джерел тепла, іскор або відкритого полум'я. Упевнитися, що пляшки завжди закриті належним чином. Забезпечити належне вентилування під час використання. Уникати вдихання парів. Уникати довгого або тривалого контакту зі шкірою.

4.5. Стандартний розчин лауріл арахідату (*Примітка 3*), на 0,05 % (м/об) у гептані (внутрішній стандарт для восків).

Примітка 3: Також можна використовувати пальмітил пальмітат, міристилстеарат або арахідил лауреат.

4.6. Стандартний розчин метилгептадеканоату, на 0,02 % (м/об) у гептані (внутрішній стандарт для метилових і етилових ефірів).

4.7. Судан 1 (1-фенилазо-2-нафтол).

4.8. Газ-носії: водень або гелій, чистий, для газової хроматографії.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Водень. Легкозаймистий, під тиском. Тримати подалі від джерел тепла, іскор, відкритого вогню або електричного обладнання, виготовленого не з незаймистого матеріалу. Переконайтеся, що клапан балона закритий, коли він не використовується. Завжди використовувати з редукторами тиску. Зняти напругу з пружини редукційного клапана, перш ніж відкривати вентиль балона. Не стояти напроти випускного отвору балона, коли відкручується вентиль. Забезпечити належне вентилування під час використання. Не переміщувати водень з одного балона в інший. Не змішувати газ у балоні. Переконайтеся, що балони не перевернуться. Тримати подалі від сонячного світла та джерел тепла. Зберігати у середовищі, що не піддається корозії. Не використовувати пошкоджені балони або такі, на яких відсутнє маркування.

Гелій. Стиснений газ під високим тиском. Він зменшує кількість кисню, доступного для дихання. Тримати пляшку закритою. Забезпечити належне вентилування під час використання. Не заходити в зони зберігання, якщо вони не вентилуються належним чином. Завжди використовувати з редукторами тиску.

Зняти напругу з пружини редукційного клапана, перш ніж відкривати вентиль балона. Не переміщувати газ з одного балона в інший. Переконайтеся, що балони не перевернуться. Не стояти напроти випускного отвору балона, коли відкручується вентиль. Тримати подалі від сонячного світла та джерел тепла. Зберігати у середовищі, що не піддається корозії. Не використовувати пошкоджені балони або такі, на яких відсутнє маркування. Не вдихати. Використовувати виключно для технічних цілей.

4.9. Допоміжні гази:

— Водень, чистий, для хроматографії.

— Повітря, чисте, для хроматографії.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Повітря. Стиснений газ під високим тиском. Слід використовувати з обережністю в присутності горючих речовин, оскільки температура самозаймання більшості органічних сполук в повітрі є значно нижчою під високим тиском. Переконайтеся, що клапан балона закритий, коли він не використовується. Завжди використовувати редуктор тиску. Зняти напругу з пружини редукційного клапана, перш ніж відкривати вентиль балона. Не стояти напроти випускного отвору балона, коли відкручується вентиль. Не переміщувати газ з одного балона в інший. Не змішувати газ у балоні. Переконайтеся, що балони не перевернуться. Тримати подалі від сонячного світла та джерел тепла. Зберігати у середовищі, що не піддається корозії. Не використовувати пошкоджені балони або такі, на яких відсутнє маркування. Повітря, призначене для технічних цілей, не повинно використовуватися для вдихання або дихальних апаратів.

5. ПРОЦЕДУРА

5.1. Підготовка хроматографічної колонки

Суспендувати 15 г силікагелю (пункт 4.1) в *n*-гексані (пункт 4.2) та ввести в колонку (пункт 3.2). Дати вільно осісти. Завершити осадження за допомогою електричного змішувача, щоб зробити хроматографічний шар більш однорідним. Перколювати 30 мл *n*-гексану, щоб усунути будь-які домішки. Зважити точно близько 500 мг зразка у колбу об'ємом 25 мл (пункт 3.1), використовуючи аналітичні ваги (пункт 3.8), та додати відповідну кількість внутрішнього стандарту (пункт 4.5), залежно від передбачуваного вмісту воску, наприклад, додати 0,1 мг лаурил арахідату у випадку оливкової олії, 0,25-0,50 мг у випадку оливкової олії з вичавок та 0,05 мг метилгептадеканоату для оливкових олій (пункт 4.6).

Перемістити підготовлений зразок до хроматографічної колонки, використовуючи дві 2 мл порції *n*-гексану (пункт 4.2).

Дозволити розчиннику витікати, доки він не досягне 1 мм над верхнім рівнем абсорбенту. Перколювати ще один *n*-гексан/етилловий ефір (99:1) і зібрати 220 мл при потоці приблизно 15 крапель кожні 10 секунд. **(Ця фракція містить метиловий та етиловий ефіри та віск).** (Примітка 4) (Примітка 5).

Примітка 4: Суміш *n*-гексан/етилловий ефір (99:1) треба готувати щодня

Примітка 5: У розчин зразка можна додати 100 мкл барвника Судан I на 1 % в суміші для елюювання, щоб візуально перевірити, що воски елюються належним чином.

Час утримання барвника залежить від температури воску та триацилгліцеролів. Отже, коли барвник досягає дна хроматографічної колонки, елюювання має бути призупинено, тому що всі воски елюювано.

Випарювати отримані фракції в ротаційному випарнику, поки не видалиться розчинник. Видалити останні 2 мл під слабким струменем азоту. Зібрати фракцію, що містить метиловий та етиловий ефіри, розвести 2-4 мл *n*-гептану або ізооктану.

5.2. Газовий хроматографічний аналіз

5.2.1. Попередня процедура

Встановити колонку в газовий хроматограф (пункт 3.3) приєднавши вхідний порт до колонкової системи, а вихідний порт — до детектора. Перевірити обладнання для газової хроматографії (функціонування газових контурів, ефективність детектора та реєстратора тощо).

Якщо колонка використовується вперше, то рекомендовано привести її в робочий стан. Пропустити легкий потік газу через колонку, потім увімкнути апарат газової хроматографії. Поступово нагрівати до досягнення температури 350 °С приблизно через 4 години.

Підтримувати цю температуру щонайменше 2 години, потім привести обладнання в робочі умови (відрегулювати потік газу, розпалити полум'я, підключити до електронного записуючого пристрою (п. 3.3.4), відрегулювати температуру печі для колонки, відрегулювати детектор тощо). Записати сигнал з чутливістю, щонайменше в два рази вищою ніж необхідна для аналізу. Базова лінія має бути лінійною, без жодних піків, і не повинна мати жодних відхилень.

Негативне зміщення прямої вказує на те, що з'єднання колонки не правильні; позитивне зміщення прямої вказує на те, що колонку не достатньо добре приведено в робочий стан.

5.2.2. Вибір робочих умов для восків та метилових та етилових ефірів (Примітка 6).

Робочі умови загалом є такими:

— Температура колонки:

20 °С/хв 5 °С/хв

80 °С спочатку (1') ————— 140 °С ————— 335 °С (20)

— Температура детектора: 350 °С.

— Введена кількість: 1 мкл розчину n-гептану (2-4 мл).

— Газ-носії: гелій або водень при оптимальній лінійній швидкості для обраного газу (див. доповнення А).

— Чутливість приладу: що підходить для виконання вищевказаних умов.

Примітка 6: Через високу кінцеву температуру дозволяється позитивне зміщення не більше як на 10 % значення усієї шкали.

Ці умови можуть бути модифіковані відповідно до характеристик колонки і газового хроматографа, щоб розділити всі воски та метилові і етилові ефіри жирних кислот і отримати задовільне розділення піків (див. рисунки 2, 3 і 4) і час утримання 18 ± 3 хвилини для внутрішнього стандарту лаурил арахідату. Найбільш репрезентативний пік восків повинен становити більше 60% від повної шкали, в той час як внутрішній стандарт метилгептадеканоату для метилових і етилових ефірів повинен досягати повномасштабного значення.

Встановити параметри інтеграції піків таким чином, щоб отримати правильну оцінку площі розглянутих піків.

5.3. Проведення аналізу

Взяти 10 мкл розчину за допомогою мікрошприца об'ємом 10 мкл, відтягуючи поршень до тих пір, поки голка не стане порожньою. Приєднати голку до системи введення і швидко ввести через 1-2 с. Через приблизно 5 с акуратно вийняти голку.

Записувати до тих пір, поки воски або стигмастадієни не елюються повністю, в залежності від аналізованої фракції.

Базовий рівень повинен завжди відповідати необхідним умовам.

5.4. Визначення піків

Визначити піки за часом утримання, порівнюючи їх із сумішами восків з відомим часом утримання, проаналізованими за тих самих умов. Алкільні ефіри ідентифікуються з сумішею метилових та етилових ефірів основних жирних кислот в оливкових оліях (пальмітинових та олеїнових).

Рисунок 1 є хроматограмою восків оливкової олії холодного пресування першого віджиму. На рисунках 2 і 3 показані хроматограми двох оливкових олій холодного пресування першого віджиму екстра класу, призначених для роздрібної торгівлі, одна з метиловими та етиловими ефірами, а інша — без них. На рисунку 4 наведені хроматограми для оливкової олії холодного пресування першого віджиму екстра класу найвищої якості та тієї ж самої олії, розбавленої 20% дезодорованої олії.

5.5. Кількісний аналіз восків

Визначити площу піків, що відповідають внутрішньому стандарту лаурил арахідату та алифатичним ефірам від C₄₀ до C₄₆, використовуючи інтегратор.

Визначити загальний вміст восків, додаючи кожний окремий віск в мг/кг жиру за такими формулами:

$$\text{Waxes, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

де:

A_x = площа, що відповідає піку для окремого ефіру, розраховується за допомогою комп'ютерної програми

A_s = площа, що відповідає піку внутрішнього стандарту лаурил арахідату, розраховується за допомогою комп'ютерної програми

m_s = маса доданого внутрішнього стандарту лаурил арахідату, в міліграмах;

m = маса зразка, взятого для визначення, в грамах.

5.5.1. Кількісний аналіз метилового і етилового ефірів

За допомогою інтегратора визначити площі піків, що відповідають внутрішньому стандарту метилгептадеканоату, метиловим ефірам C₁₆ і C₁₈ та етиловим ефірам C₁₆ та C₁₈ жирних кислот.

Визначити вміст кожного алкілового ефіру, в мг/кг жиру за такими формулами:

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

де:

A_x = площа, що відповідає піку для окремих ефірів C₁₆ і C₁₈, розраховується за допомогою комп'ютерної програми

A_s = площа, що відповідає піку для внутрішнього стандарту метилгептадеканоату, розраховується за допомогою комп'ютерної програми

m_s = додана маса внутрішнього стандарту метилгептадеканоату, в міліграмах;

m = маса зразка, взятого для визначення, в грамах.

6. ВИРАЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зазначити суму вмісту різних восків від C₄₀ до C₄₆ (Примітка 7) у міліграмах на кілограм жиру.

Зазначити суму метилових і етилових ефірів від C₁₆ до C₁₈ і загальний вміст обох.

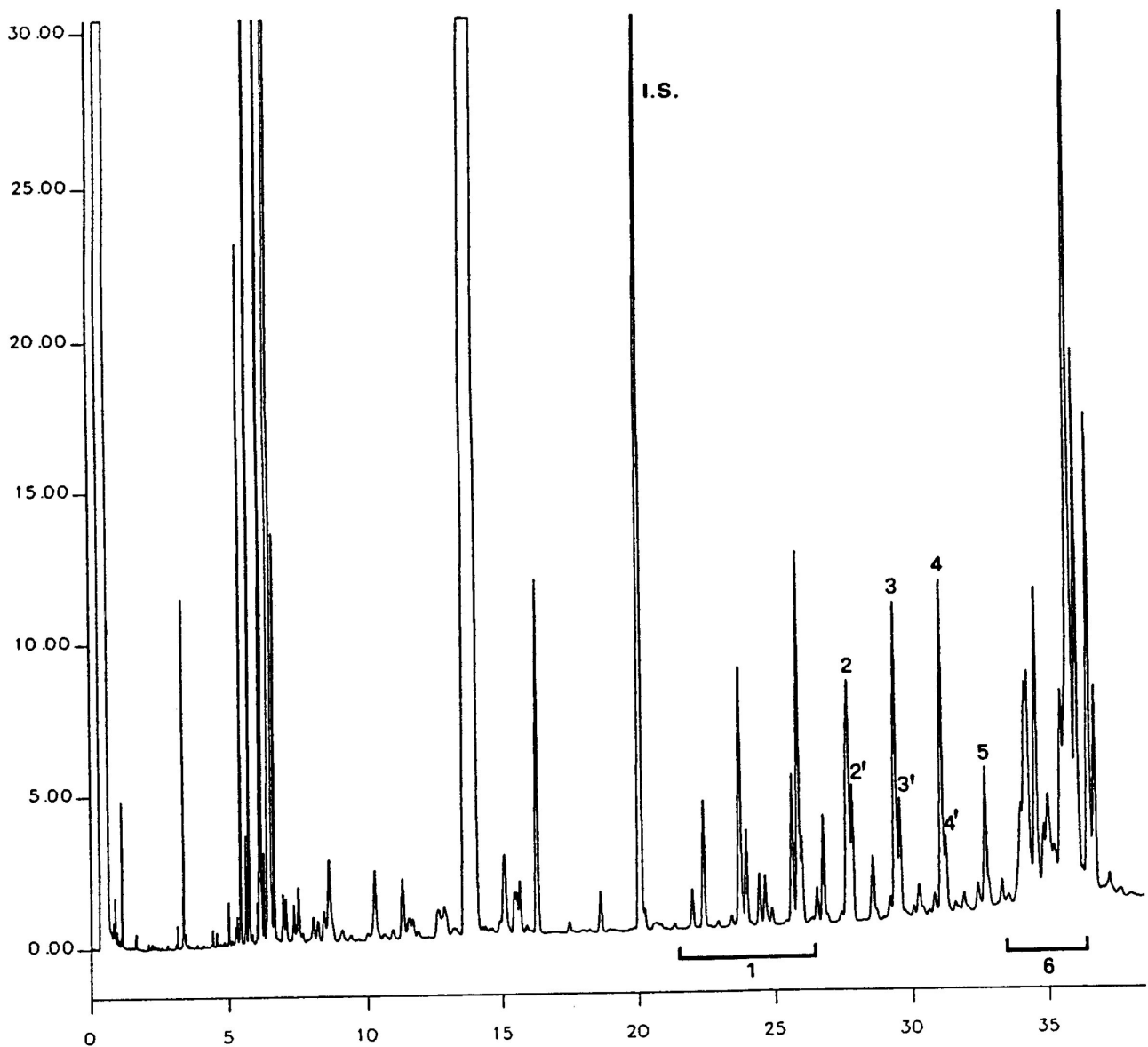
Результати виразити з точністю мг/кг.

Примітка 7: Компоненти для кількісного оцінювання відносяться до піків з парною кількістю атомів вуглецю серед ефірів C₄₀ – C₄₆, відповідно до прикладу хроматограми восків в оливковій олії, представленої на доданому рисунку. Для цілей ідентифікації, якщо ефір C₄₆ розщеплюється, рекомендується аналізувати воскову фракцію оливкової олії з вичавок, де пік C₄₆ помітний, оскільки він явно переважає.

Вказати співвідношення між етиловими і метиловими ефірами

Рисунок 1

Приклад газової хроматограми воскової фракції оливкової олії (6)



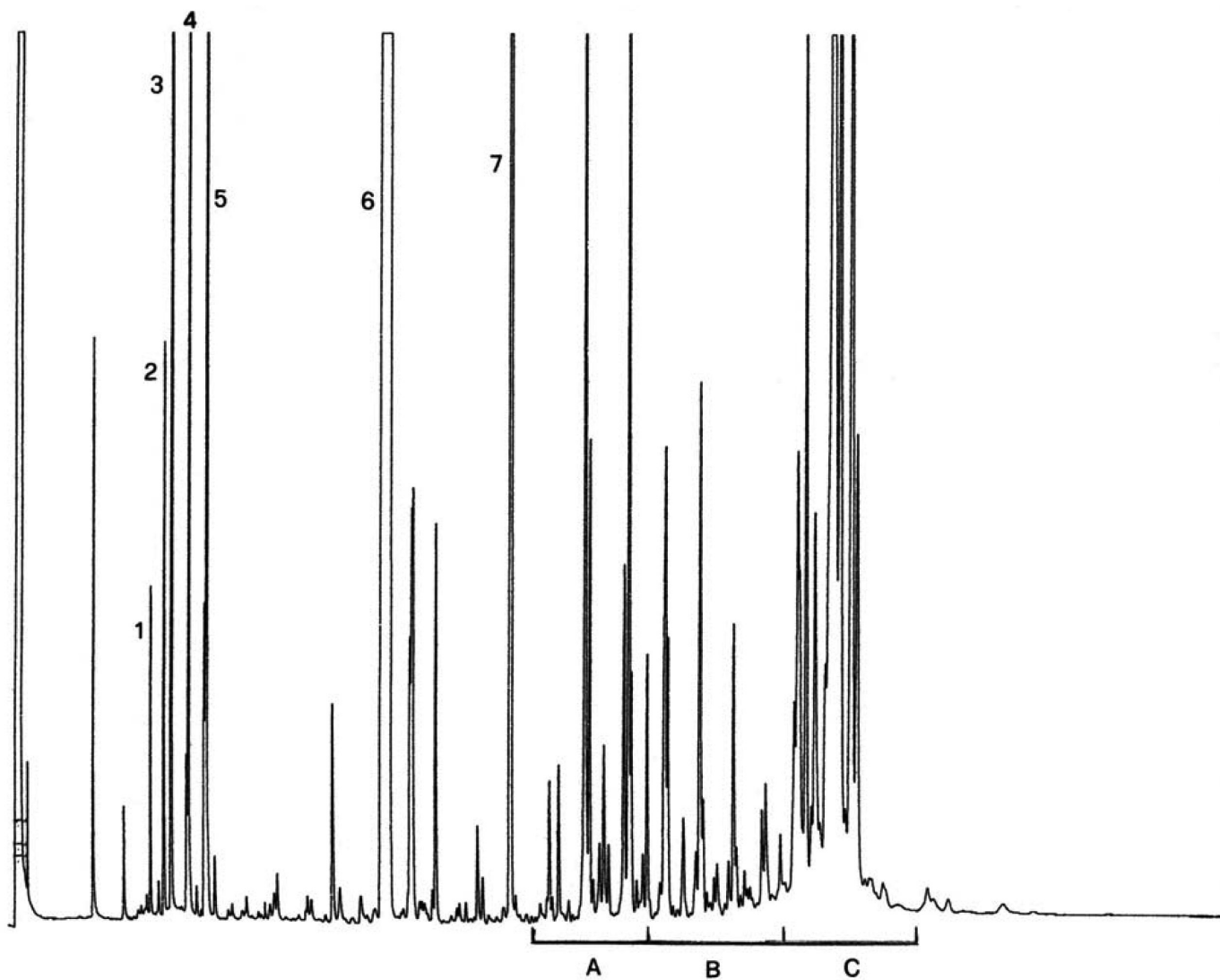
Піки з часом утримання від 5 до 8 хвилин метилового та етилового ефіру жирних кислот

Умовні позначення:

- I.S. = Лаурил арахідат
- 1 = Дитерпенові ефіри
- 2+2' = Ефіри C_{40}
- 3+3' = Ефіри C_{42}
- 4+4' = C_{44} ефіри
- 5 = Ефіри C_{46}
- 6 = Стерольні ефіри і тритерпенові спирти

Рисунок 2

Метиліві ефіри, етилові ефіри і воски у оливковій олії холодного пресування першого віджиму

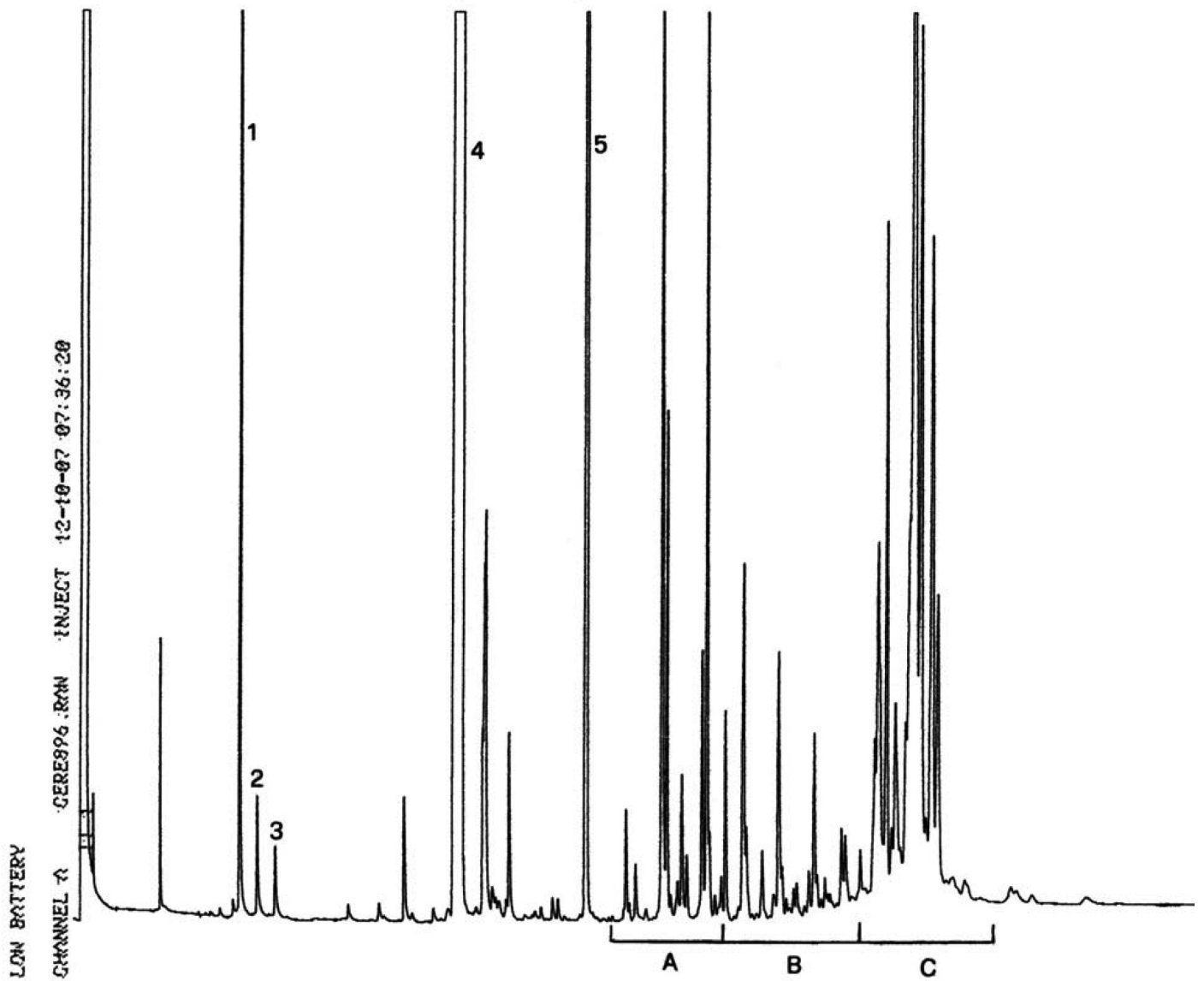


Умовні позначення:

- | | | |
|---|---|---------------------------------------|
| 1 | – | Метил C ₁₆ |
| 2 | – | Етил C ₁₆ |
| 3 | – | Метилгептадеканоат I.S. |
| 4 | – | Метил C ₁₈ |
| 5 | – | Етил C ₁₈ |
| 6 | – | Сквален |
| 7 | – | Лаурил арахідат I.S. |
| A | – | Дитерпенові ефіри |
| B | – | Воски |
| C | – | Стеролові ефіри та тритерпенові ефіри |

Рисунок 3

Метиліві ефіри, етилові ефіри і воски в оливковій олії холодного пресування першого віджиму екстра класу

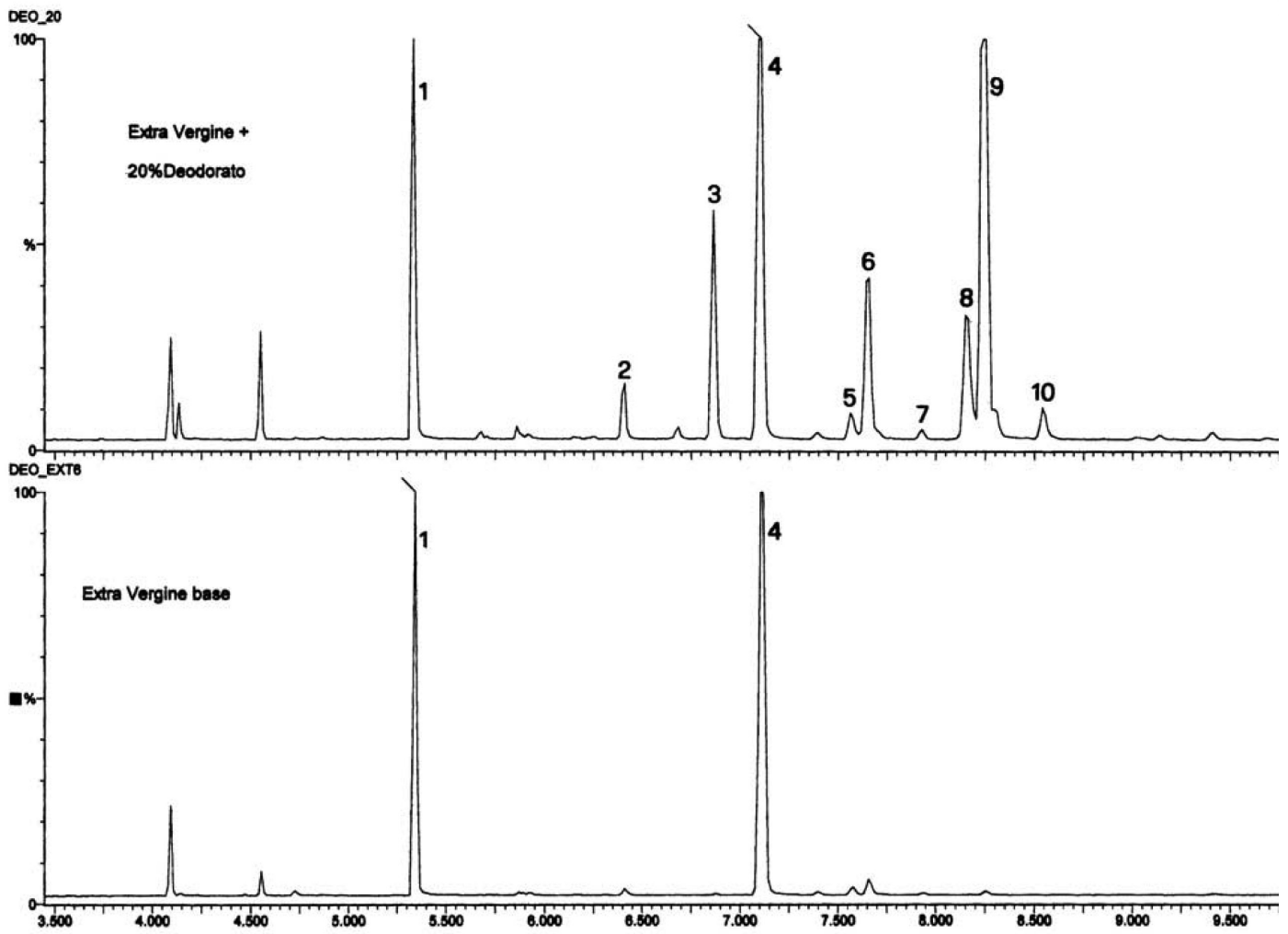


Умовні позначення:

- | | | |
|---|---|---------------------------------------|
| 1 | – | Метилгептадеканоат I.S. |
| 2 | – | Метил C ₁₈ |
| 3 | – | Етил C ₁₈ |
| 4 | – | Сквален |
| 5 | – | Лаурил арахідат I.S. |
| A | – | Дитерпенові ефіри |
| B | – | Воски |
| C | – | Стеролові ефіри та тритерпенові ефіри |

Рисунок 4

Частина хроматограми оливкової олії холодного пресування першого віджиму екстра класу і тієї ж олії, розбавленої дезодорованою олією



Умовні позначення:

- 1 – Метил міристант I.S.
- 2 – Метил пальмітант
- 3 – Етил пальмітант
- 4 – Метилгептадеканоат I.S.
- 5 – Метил лінолеат
- 6 – Метил олеат
- 7 – Метил стеарат
- 8 – Етил лінолеат
- 9 – Етил олеат
- 10 – Етил стеарат

(¹) Внутрішній ринок (виробничі потужності, розливання в пляшки, роздрібна торгівля), експорт, імпорт.

(²) Кожна характеристика оливкової олії, визначена у Додатку I, має код.

(³) Відповідає/не відповідає.

(⁴) Не вимагається для оливкової олії і для оливкової олії з вичавок.

(¹) ОВ L 228, 01.09.2009, с. 3.

(²) Директива Європейського Парламенту і Ради 2011/91/ЄС від 13 грудня 2011 року про зазначення чи знаки, що ідентифікують партію, до якої належить харчовий продукт (ОВ L 334, 16.12.2011, с. 1).

(³) Після елюювання стерольних ефірів сліди хроматограми не повинні мати ніяких значущих піків (тригліцеридів).

(⁴) Регламент Європейського Парламенту і Ради (ЄС) № 1308/2013 від 17 грудня 2013 року про спільну організацію ринків сільськогосподарських продуктів та скасування регламентів Ради (ЄЕС) № 922/72, (ЄЕС) № 234/79, (ЄС) № 1037/2001 та (ЄС) № 1234/2007 (ОВ L 347, 20.12.2013, с. 671).

(⁵) Вони можуть утриматися від дегустації олії, якщо помітять якусь надзвичайно інтенсивну негативну характеристику прямими нюховими засобами, і в такому разі вони фіксують таку виняткову обставину у формі оцінювання.

(⁶) Після елюювання стерольних ефірів сліди хроматограми не повинні мати ніяких значущих піків (триацилгліцеролів).