

Tento dokument je třeba brát jako dokumentační nástroj a instituce nenesou jakoukoli odpovědnost za jeho obsah

► **B****NAŘÍZENÍ KOMISE (EHS) č. 2568/91**

ze dne 11. července 1991

o charakteristikách olivového oleje a olivového oleje z pokrutin a o příslušných metodách analýzy

(Úř. věst. L 248, 5.9.1991, s. 1)

Ve znění:

		Úřední věstník		
		Č.	Strana	Datum
► <u>M1</u>	Nařízení Komise (EHS) č. 3682/91 ze dne 17. prosince 1991	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u>	Nařízení Komise (EHS) č. 1429/92 ze dne 26. května 1992	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u>	Commission Regulation (EEC) No 1683/92 of 29 June 1992 (*)	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u>	Commission Regulation (EEC) No 1996/92 of 15 July 1992 (*)	L 199	18	18.7.1992
► <u>M5</u>	Nařízení Komise (EHS) č. 3288/92 ze dne 12. listopadu 1992	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u>	Nařízení Komise (EHS) č. 183/93 ze dne 29. ledna 1993	L 22	58	30.1.1993
► <u>M7</u>	změněné nařízením Komise (EHS) č. 826/93 ze dne 6. dubna 1993	L 87	6	7.4.1993
► <u>M8</u>	Commission Regulation (EEC) No 620/93 of 17 March 1993 (*)	L 66	29	18.3.1993
► <u>M9</u>	Nařízení Komise (ES) č. 177/94 ze dne 28. ledna 1994	L 24	33	29.1.1994
► <u>M10</u>	Commission Regulation (EC) No 2632/94 of 28 October 1994 (*)	L 280	43	29.10.1994
► <u>M11</u>	Nařízení Komise (ES) č. 656/95 ze dne 28. března 1995	L 69	1	29.3.1995
► <u>M12</u>	Commission Regulation (EC) No 2527/95 of 27 October 1995 (*)	L 258	49	28.10.1995
► <u>M13</u>	Commission Regulation (EC) No 2472/97 of 11 December 1997 (*)	L 341	25	12.12.1997
► <u>M14</u>	Nařízení Komise (ES) č. 282/98 ze dne 3. února 1998	L 28	5	4.2.1998
► <u>M15</u>	Commission Regulation (EC) No 2248/98 of 19 October 1998 (*)	L 282	55	20.10.1998
► <u>M16</u>	Nařízení Komise (ES) č. 379/1999 ze dne 19. února 1999	L 46	15	20.2.1999
► <u>M17</u>	Commission Regulation (EC) No 455/2001 of 6 March 2001 (*)	L 65	9	7.3.2001
► <u>M18</u>	Commission Regulation (EC) No 2042/2001 of 18 October 2001 (*)	L 276	8	19.10.2001
► <u>M19</u>	Commission Regulation (EC) No 796/2002 of 6 May 2002 (*)	L 128	8	15.5.2002
► <u>M20</u>	Nařízení Komise (ES) č. 1989/2003 ze dne 6. listopadu 2003	L 295	57	13.11.2003
► <u>M21</u>	Nařízení Komise (ES) č. 702/2007 ze dne 21. června 2007	L 161	11	22.6.2007
► <u>M22</u>	Nařízení Komise (ES) č. 640/2008 ze dne 4. července 2008	L 178	11	5.7.2008
► <u>M23</u>	Nařízení Komise (EU) č. 61/2011 ze dne 24. ledna 2011	L 23	1	27.1.2011
► <u>M24</u>	Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 661/2012 ze dne 19. července 2012	L 192	3	20.7.2012

Opraveno:

- **C1** Oprava, Úř. věst. L 48, 23.2.2011, s. 19 (61/2011)

(*) Tento akt nebyl nikdy publikován v češtině.

**NAŘÍZENÍ KOMISE (EHS) č. 2568/91****ze dne 11. července 1991****o charakteristikách olivového oleje a olivového oleje z pokrutin a o příslušných metodách analýzy**

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na nařízení Rady č. 136/66/EHS ze dne 22. září 1966 o zřízení společné organizace trhu s oleji a tuky ⁽¹⁾, naposledy pozměněné nařízením (EHS) č. 3577/90 ⁽²⁾, a zejména na článek 35a uvedené nařízení,

vzhledem k tomu, že příloha nařízení č. 136/66/EHS obsahuje označení a definice olivového oleje a olivového oleje z pokrutin, které jsou uváděny na trh v jednotlivých členských státech, v rámci obchodu uvnitř Společenství a v rámci obchodu s třetími zeměmi;

vzhledem k tomu, že za účelem rozlišování mezi různými druhy olivového oleje je nutno definovat fyzikální a chemické vlastnosti každého z nich, jakož i organoleptické vlastnosti panenského olivového oleje, aby byla zaručena čistota a jakost daných výrobků, aniž jsou dotčena jiná existující ustanovení;

vzhledem k tomu, že přítomnost charakteristik různých druhů olivového oleje je nutno stanovit v celém Společenství jednotně; že za tímto účelem je třeba vypracovat metody Společenství pro chemickou analýzu a organoleptické hodnocení; že v přechodném období je nutno povolit používání jiných metod analýzy v členských státech s podmínkou, že v případě rozdílných výsledků budou rozhodující výsledky získané metodou Společenství;

vzhledem k tomu, že definice fyzikálních a chemických vlastností olivového oleje a metod analýzy způsobuje změnu doplňkových poznámek ke kapitole 15 kombinované nomenklatury;

vzhledem k tomu, že metoda hodnocení organoleptických vlastností panenského olivového oleje zahrnuje sestavení zkušebních komisí z vybraných a vyškolených posuzovatelů; že období nezbytné pro vytvoření takové struktury je proto třeba pevně stanovit; že s ohledem na potíže, s nimiž se některé členské státy setkají při sestavování zkušebních komisí posuzovatelů, je nutno povolit využití zkušebních komisí sestavených v jiných členských státech;

⁽¹⁾ Úř. věst. 172, 30.9.1966, s. 3025/66.

⁽²⁾ Úř. věst. L 353, 17.12.1990, s. 23.

▼B

vzhledem k tomu, že v zájmu zajištění správného fungování režimu dávek na dovoz olivových pokrutin je nutno stanovit jednotnou metodu pro stanovení obsahu oleje v těchto produktech;

vzhledem k tomu, že v zájmu hladkého fungování trhu je třeba přijmout opatření, aby bylo možné olivový olej stočený do obalů před vstupem tohoto nařízení v platnost umístit během omezeného časového období na trhu;

vzhledem k tomu, že je nutné zrušit nařízení Komise (EHS) č. 1058/77 ⁽¹⁾, naposledy pozměněné nařízením (EHS) č. 1858/88 ⁽²⁾;

vzhledem k tomu, že Řídící výbor pro oleje a tuky nezaujal stanovisko ve lhůtě stanovené jeho předsedou,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

▼M20*Článek 1*

1. Oleje s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodech 1 a 2 přílohy I tohoto nařízení, jsou považovány za panenské olivové oleje ve smyslu bodu 1 písm. a) a b) přílohy nařízení č. 136/66/EHS.
2. Olej s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodu 3 přílohy I tohoto nařízení, je považován za lampantový olivový olej ve smyslu bodu 1 písm. c) přílohy nařízení č. 136/66/EHS.
3. Olej s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodu 4 přílohy I tohoto nařízení, je považován za rafinovaný olivový olej ve smyslu bodu 2 přílohy nařízení č. 136/66/EHS.
4. Olej s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodu 5 přílohy I tohoto nařízení, je považován za olivový olej obsahující směs rafinovaného olivového oleje a panenského olivového oleje ve smyslu bodu 3 přílohy nařízení č. 136/66/EHS.
5. Olej s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodu 6 přílohy I tohoto nařízení, je považován za surový olivový olej z pokrutin ve smyslu bodu 4 přílohy nařízení č. 136/66/EHS.
6. Olej s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodu 7 přílohy I tohoto nařízení, je považován za rafinovaný olivový olej z pokrutin ve smyslu bodu 5 přílohy nařízení č. 136/66/EHS.
7. Olej s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodu 8 přílohy I tohoto nařízení, je považován za olivový olej z pokrutin ve smyslu bodu 6 přílohy nařízení č. 136/66/EHS.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 128, 24.5.1977, s. 6.

⁽²⁾ Úř. věst. L 166, 1.7.1988, s. 10.

▼ B*Článek 2*

1. Charakteristiky olivových olejů uvedených v příloze I se stanoví v souladu s těmito metodami analýzy:

- stanovení volných mastných kyselin, vyjádřených v procentech kyseliny olejové, metodou uvedenou v příloze II,
- stanovení peroxidového čísla metodou uvedenou v příloze III,

▼ M19

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

▼ B

- stanovení obsahu sterolů metodou uvedenou v příloze V,
- stanovení erythrodiolu a uvaolu metodou uvedenou v příloze VI,

▼ M21

— pro stanovení procentního podílu 2-glyceril monopalmitátu metodou uvedenou v příloze VII,

▼ M20

▼ B

- spektrofotometrická analýza metodou uvedenou v příloze IX,
- stanovení složení mastných kyselin metodou uvedenou v přílohách XA a XB,
- stanovení těkavých halogenovaných rozpouštědel metodou uvedenou v příloze XI,
- hodnocení organoleptických vlastností panenského olivového oleje metodou uvedenou v příloze XII, používanou v souladu s odstavcem 2,

▼ M20

▼ M11

— stanovení stigmastadienolů metodou uvedenou v příloze XVII,

▼ M13

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

▼ M19

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

▼ M23

— metoda stanovení obsahu vosků, methylesterů mastných kyselin a ethylesterů mastných kyselin kapilární plynovou chromatografií je stanovena v příloze XX.

▼ M19

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

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

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

▼ M17

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

▼ M19

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

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

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

▼ M17

4. ► **M20** Pro účely ověření podle odstavce 3 se analýzy uvedené v přílohách II, III, IX, X a XII, jakož i případné kontrolní analýzy stanovené vnitrostátními právními předpisy, provádějí před datem minimální trvanlivosti. Pokud se odběr vzorků provede více než čtyři měsíce před datem minimální trvanlivosti, analýzy se provedou nejpozději ve čtvrtém měsíci po odebrání vzorku. Pro ostatní analýzy tohoto nařízení neplatí žádné lhůty. ◀

▼ M17

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

▼ M19

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

▼ M20*Článek 2a*

Vnitrostátní orgány nebo jejich zástupci mohou ověřit, zda je vzorek v souladu s deklarovanou kategorií:

- a) buď provedením analýz uvedených v příloze I v jakémkoli pořadí;
- b) nebo v pořadí uvedeném v příloze Ib v rozhodovacím schématu, dokud není dosaženo jedno z rozhodnutí uvedených v rozhodovacím schématu.

▼ M19

▼ M5**► M19 Článek 3 ◀**

Pokud se zjistí rozdíly mezi zjištěnými organoleptickými vlastnostmi a těmi, které vyplývají z označení výrobku, uloží daný členský stát, aniž jsou dotčeny jakékoli další sankce, administrativní finanční sankce, jejich výše se stanoví podle závažnosti zjištěné nesrovnalosti.

Při posuzování nesrovnalostí se berou v úvahu přirozené změny vlastností olejů uchovávaných v běžných podmínkách.

Na začátku každého pololetí členské státy informují Komisi o počtu a druhu zjištěných nesrovnalostí a sankcí uložených v průběhu předšlého pololetí.

*Článek 4***▼ M19**

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

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

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

▼ M19

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

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

▼ M5

2. Pokud členský stát narazí na potíže při sestavování zkušebních komisí na svém území, může povolát zkušební komisi schválenou v jiném členském státě.

3. Každý členský stát vypracuje seznam zkušebních komisí sestavených profesionálními nebo mezioborovými organizacemi za podmínek stanovených v odstavci 1 a zajistí dodržování těchto podmínek.

▼ M19**▼ B***Článek 6*

1. Obsah oleje u pokrutin z oliv a jiných zbytků po extrakci olivového oleje (podpoložky 2306 90 11 a 2306 90 19) se stanoví metodou uvedenou v příloze XV.

2. Obsah oleje, na který odkazuje odstavec 1, se vyjadřuje v procentech hmotnosti oleje v sušině.

▼ M20*Článek 7*

Pokud jde o přítomnost kontaminujících látek, použijí se příslušné předpisy Společenství.

Pokud jde o halogenovaná rozpouštědla, zavádějí se pro všechny kategorie olivového oleje tyto limity:

— maximální obsah každého zjištěného halogenovaného rozpouštědla: 0,1 mg/kg,

— maximální celkový obsah zjištěných halogenovaných rozpouštědel: 0,2 mg/kg.

▼ B*Článek 8*

1. Členské státy sdělí Komisi opatření přijatá k provádění tohoto nařízení.

2. Členské státy předají Komisi na začátku každého pololetí souhrn analytických údajů, které se vztahují ke zkouškám provedeným během předchozího pololetí.

▼ B

Výsledky budou přezkoumány Řídicím výborem pro oleje a tuky postupem podle článku 39 nařízení č. 136/66/EHS.

Článek 9

Nařízení (EHS) č. 1058/77 se zrušuje.

Článek 10

1. Toto nařízení vstupuje v platnost třetím dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

Metoda uvedená v příloze XII se však použije ode dne ► **M1** 1. listopadu 1992 ◀, s výjimkou případů, kdy se jedná o intervenční opatření.

▼ M5

Tato metoda se nepoužije u panenského olivového oleje stočeného před 1. listopadem 1992.

▼ B

2. Toto nařízení se nepoužije na olivový olej a olivový olej z pokrutin stočený do obalů před vstupem tohoto nařízení v platnost a uvedený na trh do 31. října 1992.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

▼ B*PŘÍLOHA***Obsah**

Příloha I:	Charakteristiky olivového oleje
Příloha I A:	Odběr vzorků ze šarží olivového oleje nebo olivového oleje z pokrutin ve spotřebitelských obalech o objemu nejvýše 100 litrů
Příloha I B:	Rozhodovací schéma
Příloha II:	► M21 Stanovení volných mastných kyselin, metoda za studena ◀
Příloha III:	Stanovení peroxidového čísla
Příloha IV:	► M6 Stanovení obsahu vosku kapilární plynovou chromatografií ◀
Příloha V:	Stanovení obsahu a složení sterolů pomocí kapilární plynové chromatografie
Příloha VI:	Stanovení erythrodiolu a uvaolu
Příloha VII:	► M21 Stanovení procentuálního podílu 2-glyceril monopalmitátu ◀

▼ M20**▼ B**

Příloha IX:	Spektrofotometrická analýza v ultrafialové oblasti spektra
Příloha X A:	Analýza methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií
Annex X B:	Preparation of the fatty acid methyl esters from olive oil and olive-pomace oil
Příloha XI:	Stanovení těkavých halogenovaných rozpouštědel v olivovém oleji
Annex XII:	Organoleptic assessment of virgin olive oils

▼ M20**▼ M19****▼ B**

Příloha XV:	Stanovení obsahu oleje v olivových pokrutinách
Příloha XVI:	Stanovení jodového čísla
Příloha XVII:	Stanovení stigmastadienolů v rostlinných olejích
Annex XVIII:	Method for determining the content of triglycerides with ECN42
Annex XIX:	Method for determining aliphatic alcohol content

▼ M23

Příloha XX:	Metoda stanovení obsahu vosků, methylesterů mastných kyselin a ethylesterů mastných kyselin kapilární plynovou chromatografií
-------------	---

PŘÍLOHA I

CHARAKTERISTIKY OLIVOVÉHO OLEJE

Kategorie	Methylestery mastných kyselin (MMK) a ethylestery mastných kyselin (EMK)	Kyselost (%) (*)	Peroxidové číslo (mEq O ₂ /kg) (*)	Vosky mg/kg (**)	2-glyceryl monopalmitát (%)	Stigmatadien mg/kg (1)	Rozdíl mezi hodnotou ECN42 zjištěnou z HPLC a teoretickým výpočtem	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptické hodnocení Medián závad (Md)*	Organoleptické hodnocení Medián ovcnosti (Mf)*
1. Extra panenský olivový olej	Σ MMK + EMK \leq 75 mg/kg nebo 75 mg/kg < Σ MMK + EMK \leq 150 mg/kg a (EMK/MMK) \leq 1,5	\leq 0,8	\leq 20	\leq 250	\leq 0,9, pokud % kyseliny palmitové představuje \leq 14 % \leq 1,0, pokud % kyseliny palmitové představuje > 14 %	\leq 0,10	\leq 0,2	\leq 2,50	\leq 0,22	\leq 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Panenský olivový olej	—	\leq 2,0	\leq 20	\leq 250	\leq 0,9, pokud % kyseliny palmitové představuje \leq 14 % \leq 1,0, pokud % kyseliny palmitové představuje > 14 %	\leq 0,10	\leq 0,2	\leq 2,60	\leq 0,25	\leq 0,01	Md \leq 3,5	Mf > 0
3. Lampantový olivový olej	—	> 2,0	—	\leq 300 (3)	\leq 0,9, pokud % kyseliny palmitové představuje \leq 14 % \leq 1,1, pokud % kyseliny palmitové představuje > 14 %	\leq 0,50	\leq 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (2)	—
4. Rafinovaný olivový olej	—	\leq 0,3	\leq 5	\leq 350	\leq 0,9, pokud % kyseliny palmitové představuje \leq 14 % \leq 1,1, pokud % kyseliny palmitové představuje > 14 %	—	\leq 0,3	—	\leq 1,10	\leq 0,16	—	—

▼ M23

Kategorie	Methylestery mastných kyselin (MMK) a ethylestery mastných kyselin (EMK)	Kyselost (%) (*)	Peroxidové číslo (mEq O ₂ /kg) (*)	Vosky mg/kg (**)	2-glyceryl monopalmitát (%)	Stigmatadien mg/kg (1)	Rozdíl mezi hodnotou ECN42 zjištěnou z HPLC a teoretickým výpočtem	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptické hodnocení Medián závad (Md)*	Organoleptické hodnocení Medián ovocnosti (Mf)*
5. Složený z rafinovaných olivových a panenských olejů	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9, pokud % kyseliny palmitové představuje ≤ 14 % ≤ 1,0, pokud % kyseliny palmitové představuje > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Surový olivový olej z pokrutin	—	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinovaný olivový olej z pokrutin	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Olivový olej z pokrutin	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Úhrn izomerů (ne)separovatelných prostřednictvím kapilární kolony.

(2) Nebo pokud je medián závad nejvýš 3,5 a medián ovocnosti roven 0.

(3) ► **C1** Oleje s obsahem vosku mezi 300 mg/kg a 350 mg/kg se zařazují do kategorie lampantového olivového oleje, pokud je celkový obsah alifatických alkoholů nejvýše 350 mg/kg, nebo pokud je obsah erythrodiolu a uvaolu nejvýš 3,5 %. ◀

(4) ► **C1** Oleje s obsahem vosku mezi 300 mg/kg a 350 mg/kg se zařazují do kategorie surového olivového oleje z pokrutin, pokud je celkový obsah alifatických alkoholů vyšší než 350 mg/kg, nebo pokud je obsah erythrodiolu a uvaolu vyšší než 3,5 %. ◀

▼ M23

Kategorie	Obsah kyselin ⁽¹⁾						►C1 Úhrn transizomerů kyseliny olejové (%) ◀	Úhrn transizomerů kyseliny linolové+linolenové (%)	Složení sterolů						Steroly celkem (mg/kg)	Erythrodiol a uvaol (%) (**)
	Myristová (%)	Linolenová (%)	Arachidová (%)	Eikosanová (%)	Behenová (%)	►C1 Lignocerová (%) ◀			Cholesterol (%)	Brassikasterol (%)	Kampeterol (%)	Stigmasterol (%)	Betasitosterol (%) ⁽²⁾	Delta-7-stigmastenol (%)		
1. Extra panenský olivový olej	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Panenský olivový olej	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Lampantový olivový olej	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Rafinovaný olivový olej	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Olivový olej obsahující směs rafinovaných a panenských olivových olejů	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Surový olivový olej z pokrutin	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾
7. Rafinovaný olivový olej z pokrutin	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Olivový olej z pokrutin	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Obsah ostatních mastných kyselin (%): kyselina palmitová: 7,5 – 20,0; palmitoolejová: 0,3 – 3,5; heptadekanová: ≤ 0,3; heptadecenová: ≤ 0,3; stearová: 0,5–5,0; olejová: 55,0–83,0; linolová: 3,5–21,0.

⁽²⁾ Úhrn: Delta-5-23-stigmastadien + chlosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5-24-stigmastadien.

⁽³⁾ Oleje s obsahem vosku mezi 300 mg/kg a 350 mg/kg se zařazují do kategorie lampantového olivového oleje, pokud je celkový obsah alifatických alkoholů nejvýš 350 mg/kg nebo pokud je obsah erythrodiolu a uvaolu nejvýš 3,5 %.

⁽⁴⁾ Oleje s obsahem vosku mezi 300 mg/kg a 350 mg/kg se zařazují do kategorie surového olivového oleje z pokrutin, pokud je celkový obsah alifatických alkoholů vyšší než 350 mg/kg a pokud je obsah erythrodiolu a uvaolu vyšší než 3,5 %.

Poznámky:

- Výsledky zkoušek se uvádějí na stejný počet desetinných míst, jaký je předepsán pro každou charakteristiku. Poslední desetinné místo se přitom zaokrouhlí nahoru, pokud je číslice na dalším desetinném místě vyšší než 4.
- Pokud jakákoliv charakteristika neodpovídá předepsaným mezním hodnotám, zařadí se olivový olej do jiné kategorie nebo se označí jako nesplňující požadavky na čistotu pro danou jakostní kategorii.
- Jakostní charakteristiky olejů označené hvězdičkou * znamenají, že:
 - v případě lampantového olivového oleje nemusejí být stanovené mezní hodnoty dodrženy současně;
 - v případě panenských olivových olejů je nedodržení jedné nebo více mezních hodnot důvodem pro změnu kategorie v rámci skupiny panenského olivového oleje.
- Jakostní charakteristiky olejů označené dvěma hvězdičkami ** znamenají, že v případě všech olivových olejů z pokrutin nemusí být stanovené mezní hodnoty dodrženy současně.

▼ **M20***PŘÍLOHA I A***ODBĚR VZORKŮ ZE ŠARŽÍ OLIVOVÉHO OLEJE NEBO OLIVOVÉHO OLEJE Z POKRUTIN VE SPOTŘEBITELSKÝCH OBALECH O OBJEMU NEJVÝŠE 100 LITRŮ**

Tato metoda odběru vzorků se týká dodávek olivového oleje nebo olivového oleje z pokrutin nepřesahujících 125 000 litrů, stočených do spotřebitelských obalů o objemu nejvýše 100 litrů.

Pokud daná dodávka obsahuje více než 125 000 litrů, rozdělí se na přibližně stejně velké šarže o objemu nejvýše 125 000 litrů. Pokud dodávka obsahuje méně než 125 000 litrů, pak představuje jednu šarži. Metoda se pak použije u každé šarže.

Minimální počet odebraných dílčích vzorků závisí na velikosti šarže podle tabulky uvedené v bodu 1.

Velikost dílčího vzorku se určuje na základě objemu spotřebitelského obalu podle tabulky uvedené v bodu 2.1.

Dodávkou, dílčím vzorkem a laboratorním vzorkem se rozumějí definice uvedené v normě EN ISO 5555.

„Šarže“ se skládá z více prodejních jednotek, které jsou produkovány, vyrobeny a baleny za takových okolností, že olej obsažený v každé prodejní jednotce se považuje za homogenní vzhledem ke všem svým analytickým charakteristikám.

1. POČET DÍLČÍCH VZORKŮ, KTERÉ JE NUTNO ODEBRAT

Minimální počet odebraných dílčích vzorků závisí na velikosti šarže a odpovídá dále uvedené tabulce:

Velikost šarže (v litrech) menší než	Minimální počet dílčích vzorků
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125 000	5

Spotřebitelské obaly daného dílčího vzorku musí pocházet s navzájem sousedících míst šarže.

V případě pochybností členské státy zvýší počet odebraných dílčích vzorků.

2. OBSAH DÍLČÍCH VZORKŮ**2.1 Každý dílčí vzorek se skládá:**

V případě spotřebitelských obalů o objemu:	Dílčí vzorek musí obsahovat olej:
a) nejméně 5 litrů	a) ze 3 spotřebitelských obalů
b) nejméně 3 litrů, ale méně než 5 litrů	b) ze 3 spotřebitelských obalů
c) nejméně 2 litrů, ale méně než 3 litry	c) ze 3 spotřebitelských obalů
d) nejméně 1 litru, ale méně než 2 litrů	d) z 6 spotřebitelských obalů
e) nejméně 0,75 litru, ale méně než 1 litr	e) z 6 spotřebitelských obalů
f) méně než 0,75 litru	f) z trojnásobného množství oleje z minimálního počtu obalů, jejichž celkový objem je větší než 1,5 litru

▼ M20

2.2 **Dílčí vzorky musí být uchovány ve spotřebitelských obalech až do doby provedení analýzy. Olej z dílčích vzorků se pak rozdělí do tří laboratorních vzorků pro provedení:**

- a) analýz uvedených v přílohách II, III, IX a X;
- b) analýz uvedených v příloze XII;
- c) ostatních analýz.

2.3 **Obaly tvořící dílčí vzorek musí být rozděleny v souladu s kontrolními postupy, stanovenými vnitrostátními právními předpisy.**

3. ANALÝZY A VÝSLEDKY

a) Každý z dílčích vzorků, uvedených v bodu 1, se dále rozdělí na laboratorní vzorky v souladu s bodem 2.5 normy EN ISO 5555 a podléhá těmto analýzám:

- stanovení volných mastných kyselin podle čl. 2 odst. 1 první odrážky,
- stanovení peroxidového čísla podle čl. 2 odst. 1 druhé odrážky,
- spektrofotometrické analýze podle čl. 2 odst. 1 osmé odrážky,
- stanovení složení mastných kyselin podle čl. 2 odst. 1 deváté odrážky.

b) Pokud výsledky analýzy podle písmene a) nevyhovují charakteristikám deklarované kategorie olivového oleje u alespoň jednoho z dílčích vzorků odebraných ze stejné šarže, celá daná šarže se prohlásí za nevyhovující.

Pokud nejsou všechny výsledky analýzy podle písmene a) u každého z dílčích vzorků odebraných ze stejné šarže homogenní za předpokladu opakovatelnosti charakteristik daných metod, celá daná šarže se prohlásí za nehomogenní a každý dílčí vzorek musí být podroben ostatním předepsaným analýzám. V opačném případě se další předepsané analýze podrobí pouze jeden z dílčích vzorků z dané šarže.

c) Pokud jeden z výsledků analýzy podle písm. b) druhého odstavce nevyhovuje charakteristikám deklarované kategorie olivového oleje, celá daná šarže se prohlásí za nevyhovující.

Pokud všechny výsledky analýzy podle písm. b) druhého odstavce vyhovují charakteristikám deklarované kategorie olivového oleje, celá šarže se prohlásí za vyhovující.

▼ **M20***PŘÍLOHA I B***ROZHODOVACÍ SCHÉMA PRO OVĚŘENÍ SOULADU VZORKU OLIVOVÉHO OLEJE S DEKLAROVANOU KATEGORIÍ**

Soulad olivového oleje nebo olivového oleje z pokrutin je možné přezkoušet takto:

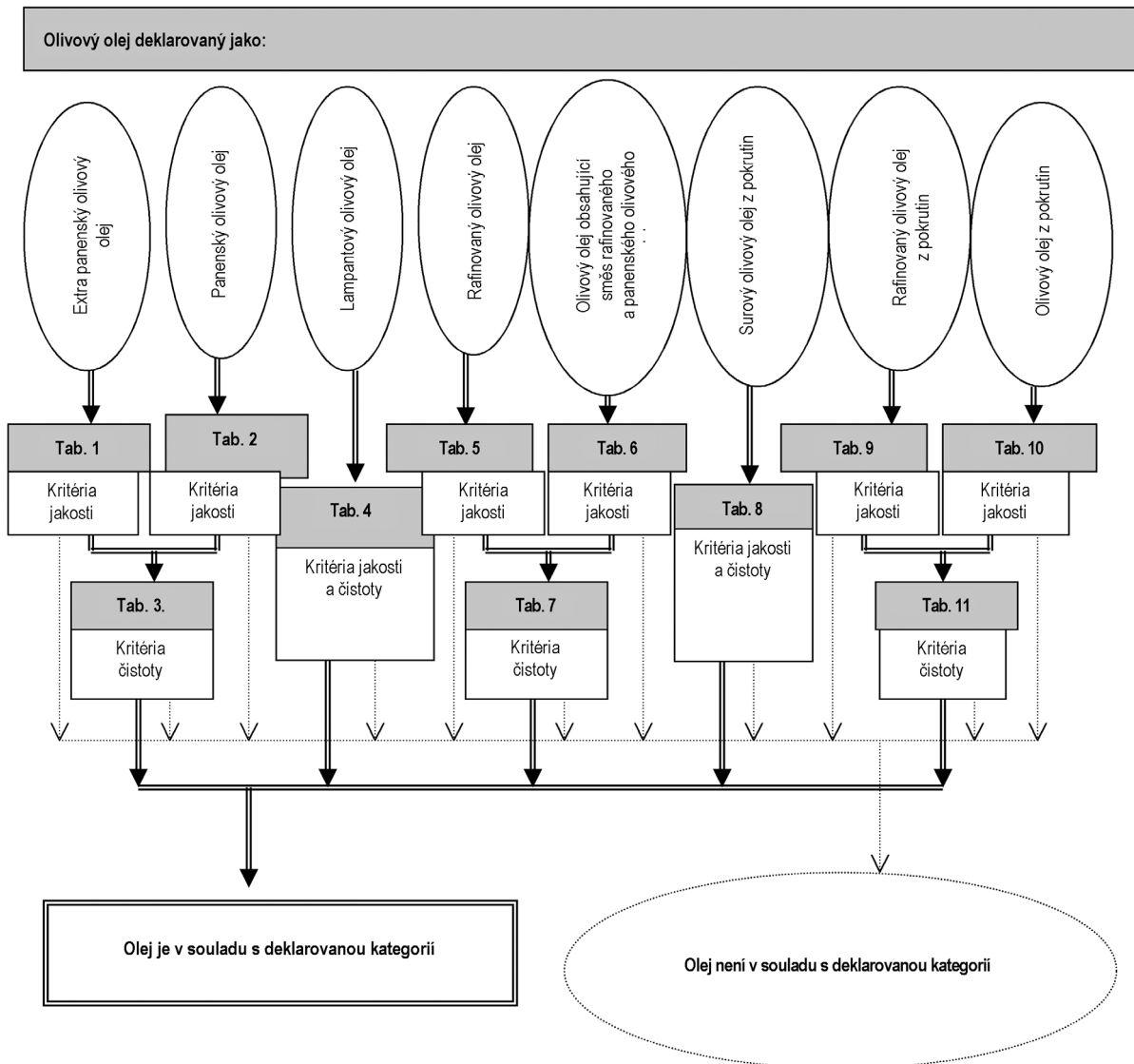
- a) ověření splnění charakteristik uvedených v příloze I provedením analýz za tímto účelem stanovených v libovolném pořadí, nebo
- b) provedením analýz uvedených v rozhodovacím schématu v něm stanoveném pořadí, dokud se nedospěje k jednomu ze stanovených rozhodnutí.

Nezávisle na tom se provádějí analýzy nutné pro ověření souladu s normami Společenství, pokud jde o případné kontaminující látky.

Rozhodovací schéma platí pro všechny kategorie olivového oleje a olivového oleje z pokrutin. Skládá se z tabulek, očíslovaných 1 až 11, které se použijí na základě deklarované kategorie daného oleje v pořadí, stanoveném ve všeobecné tabulce.

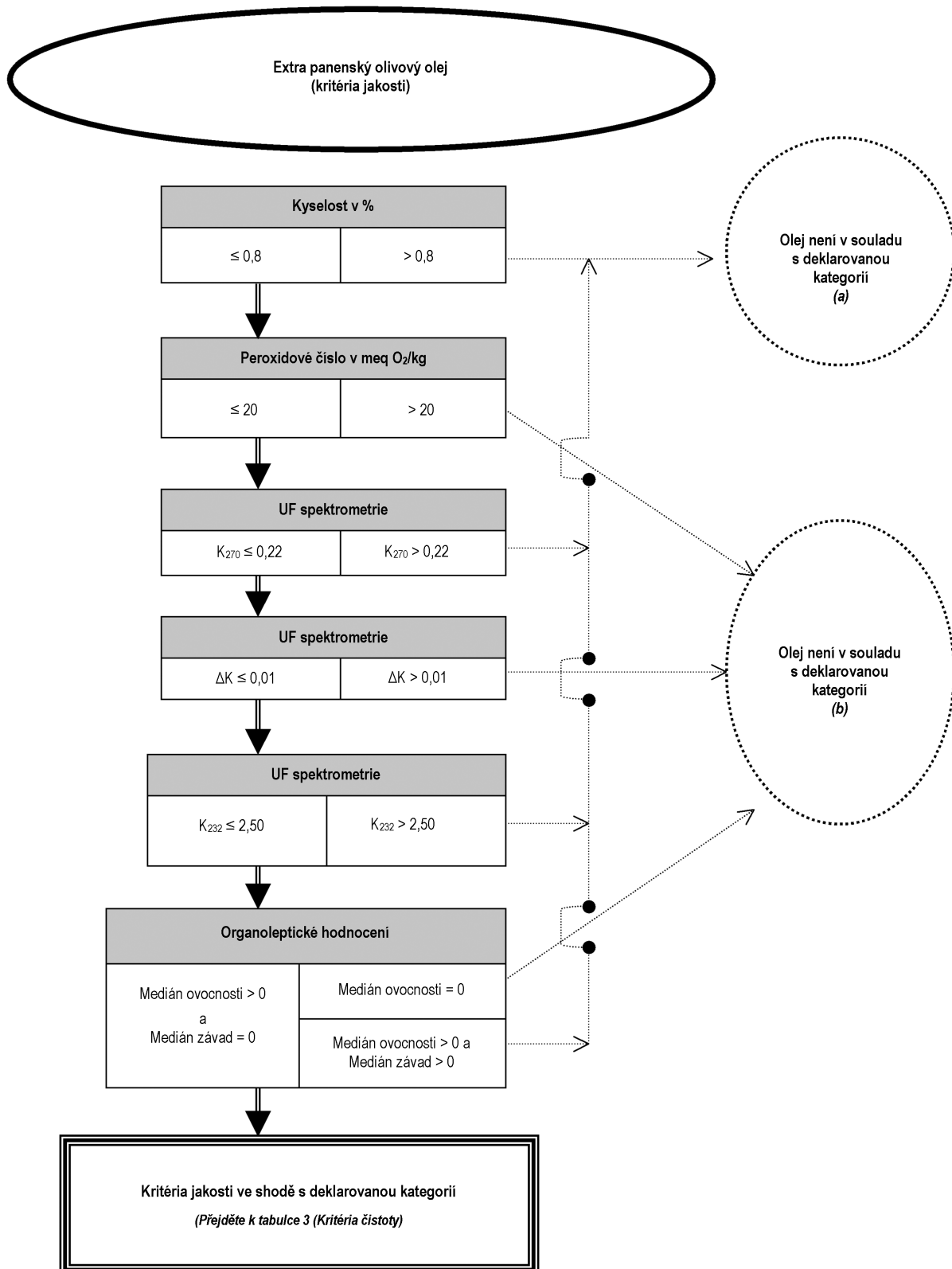
Klíč k všeobecné tabulce a k tabulkám 1 až 11:

- dvojitá čára (=) odkazuje na další krok, který je nutno provést, pokud jsou splněny podmínky předcházejícího pole. Tečkovaná čára (...) odkazuje na další krok, který nutno provést při negativním rozhodnutí,
- nadpisy v polích tabulek 1 až 11 odkazují na analýzy tohoto nařízení na základě srovnávací tabulky uvedené v dodatku 1 této přílohy,
- písmena v závorkách, nacházející se v kruzích a elipsách (negativní rozhodnutí) v tabulkách 1 až 11, odkazují na poznámky uvedené v dodatku 2 této přílohy. Písmena neznamenají automaticky, že je nutno provést další analýzy, ani nenaznačují pravdivost uvedených předpokladů.

▼ **M20**

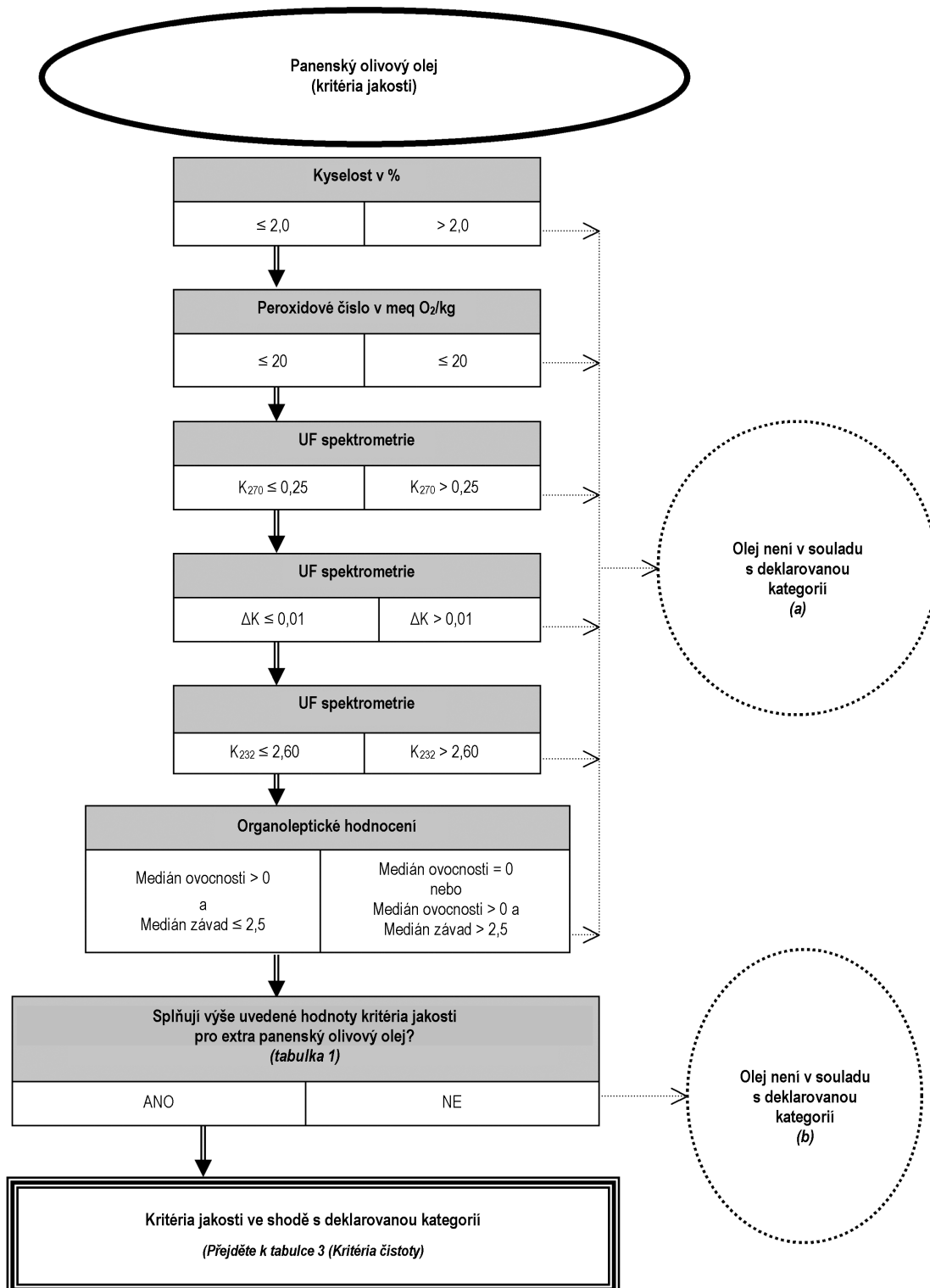
▼ **M20**

Tabulka 1



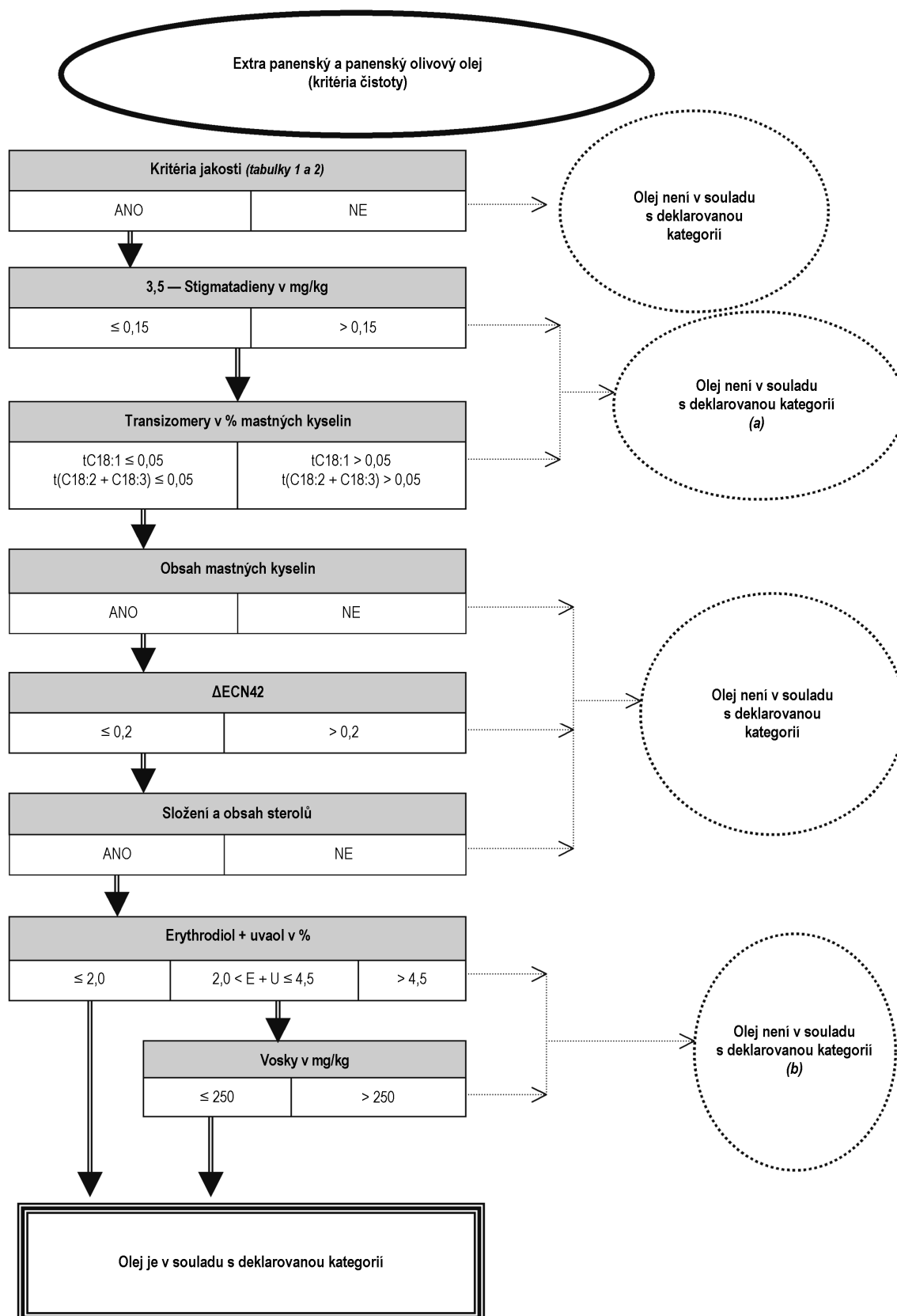
▼ M20

Tabulka 2



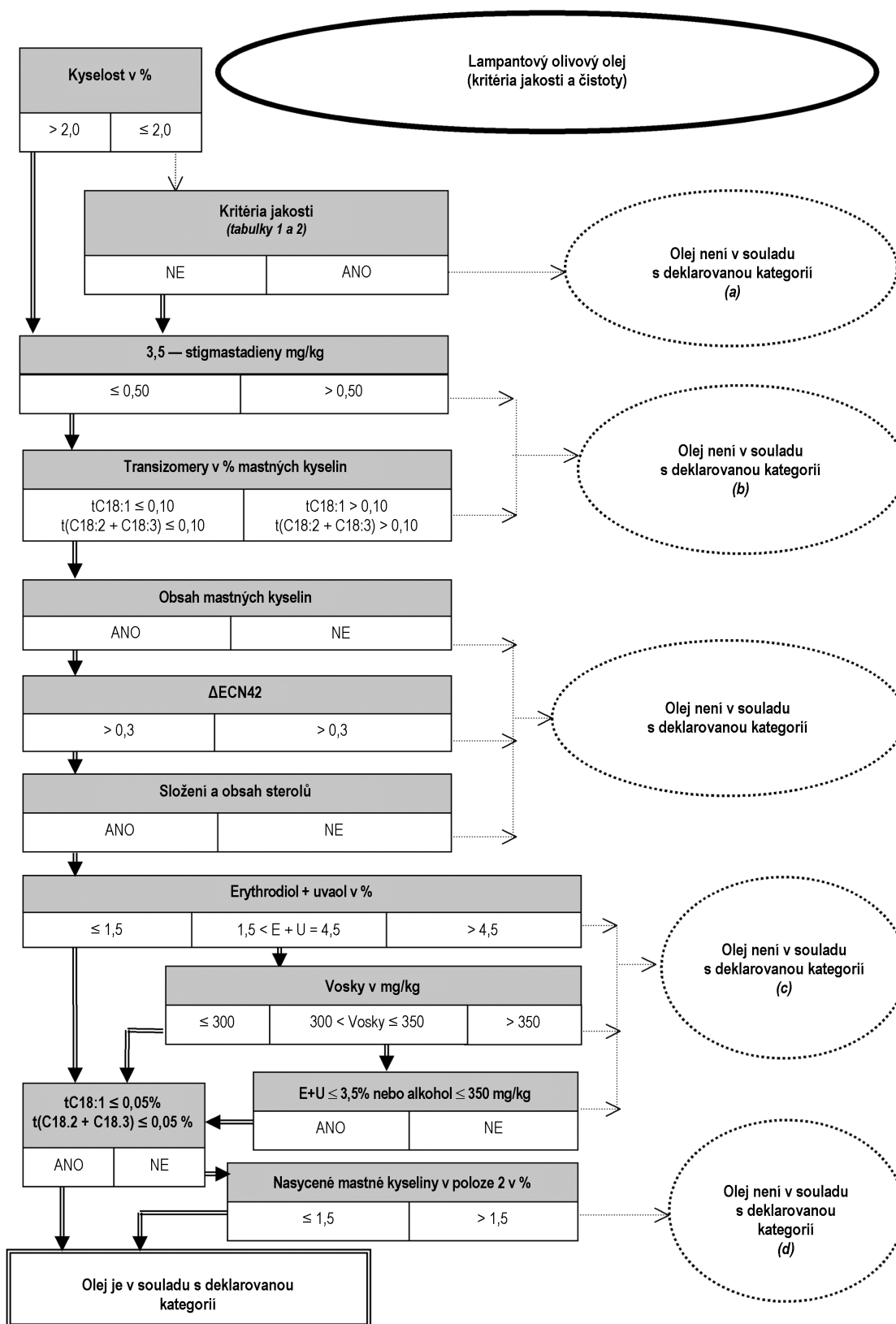
▼ M20

Tabulka 3



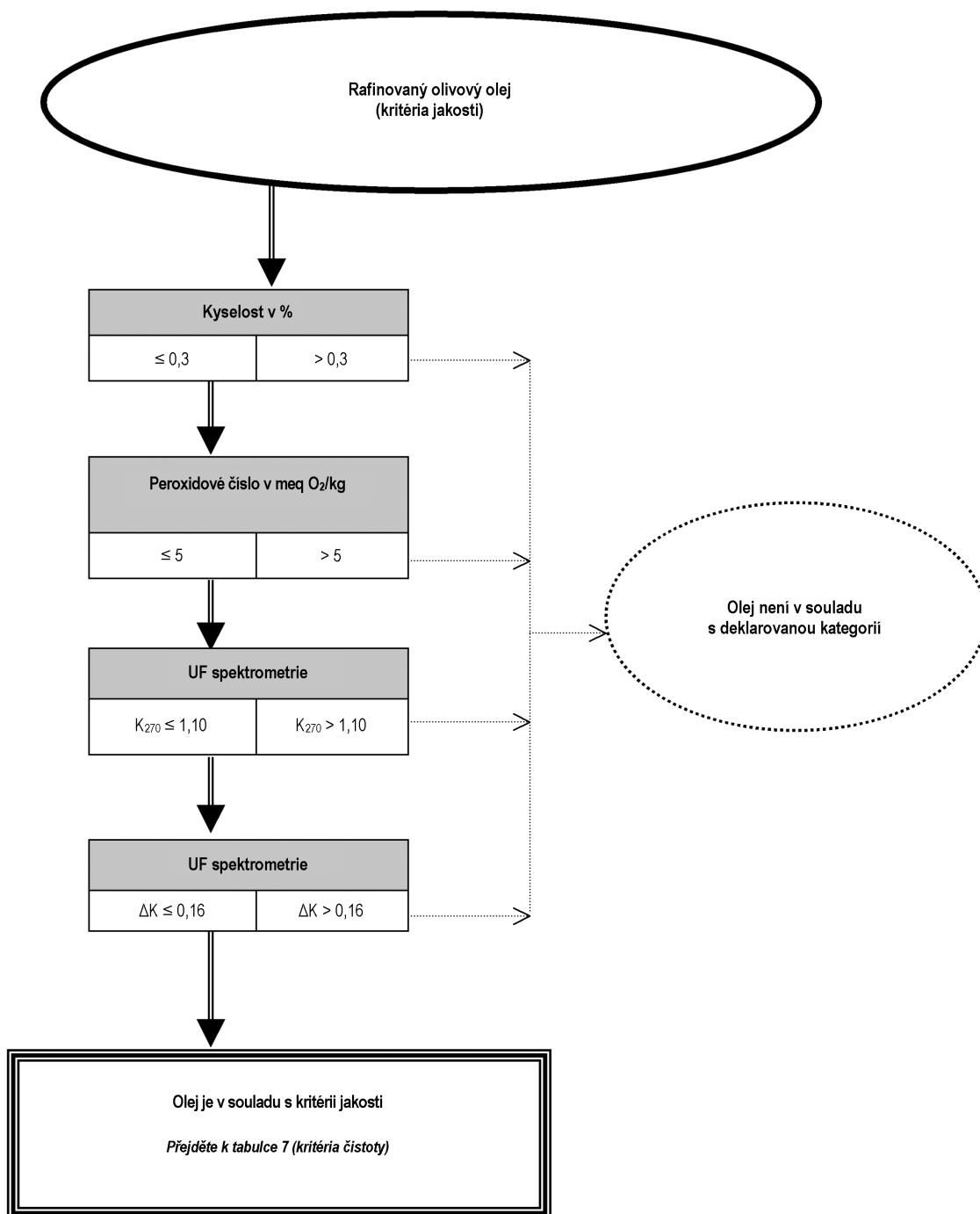
▼ M20

Tabulka 4



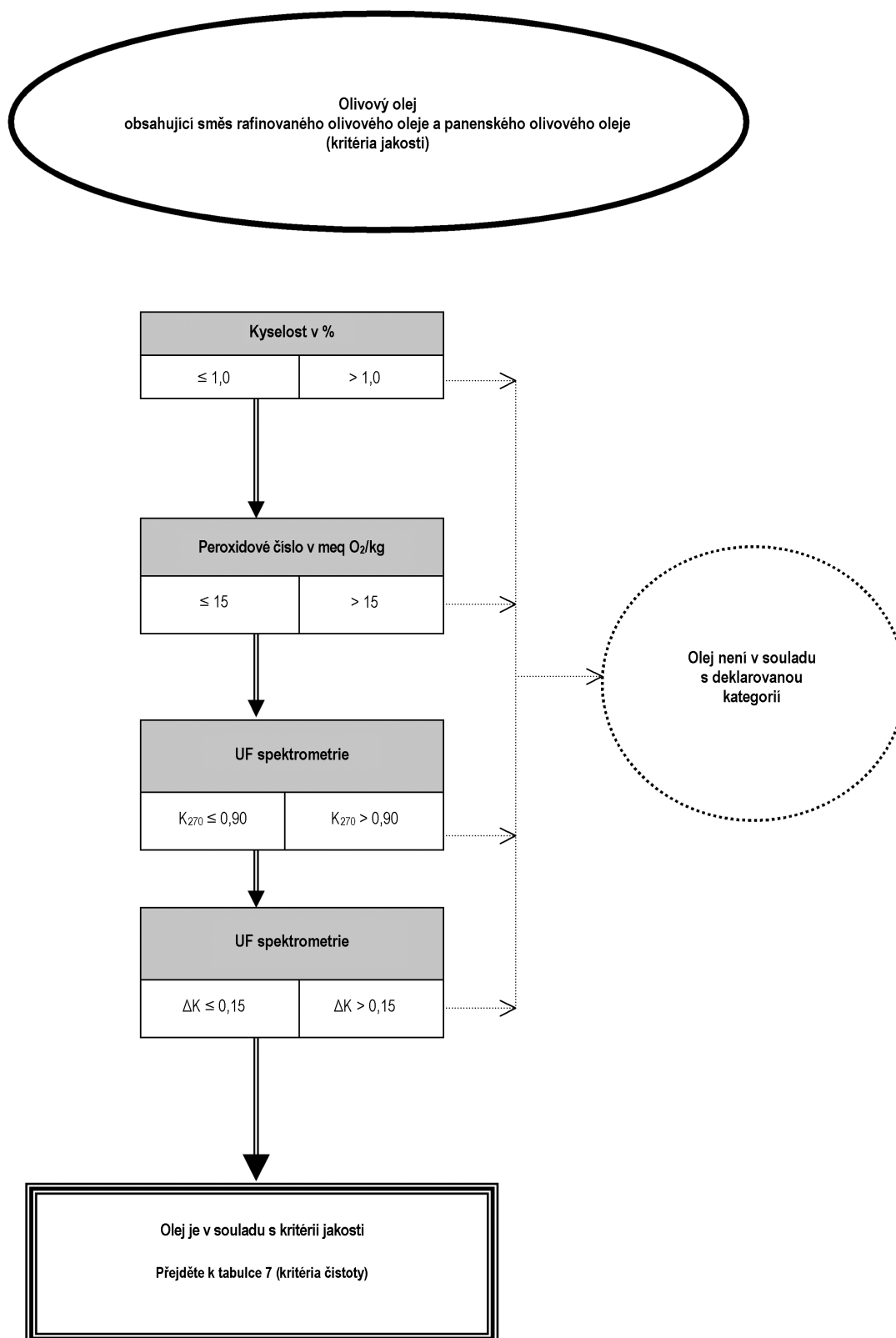
▼ **M20**

Tabulka 5



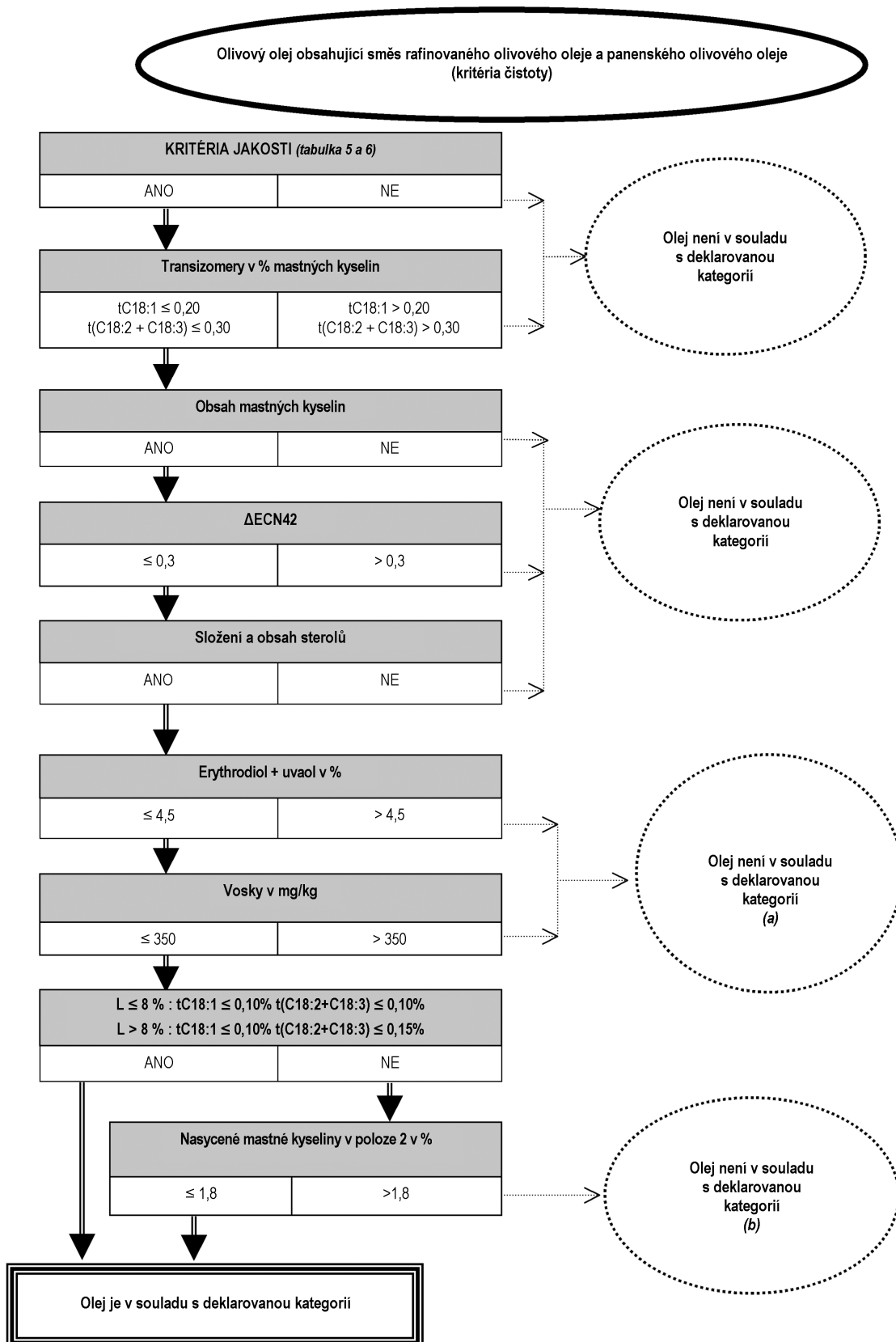
▼ M20

Tabulka 6



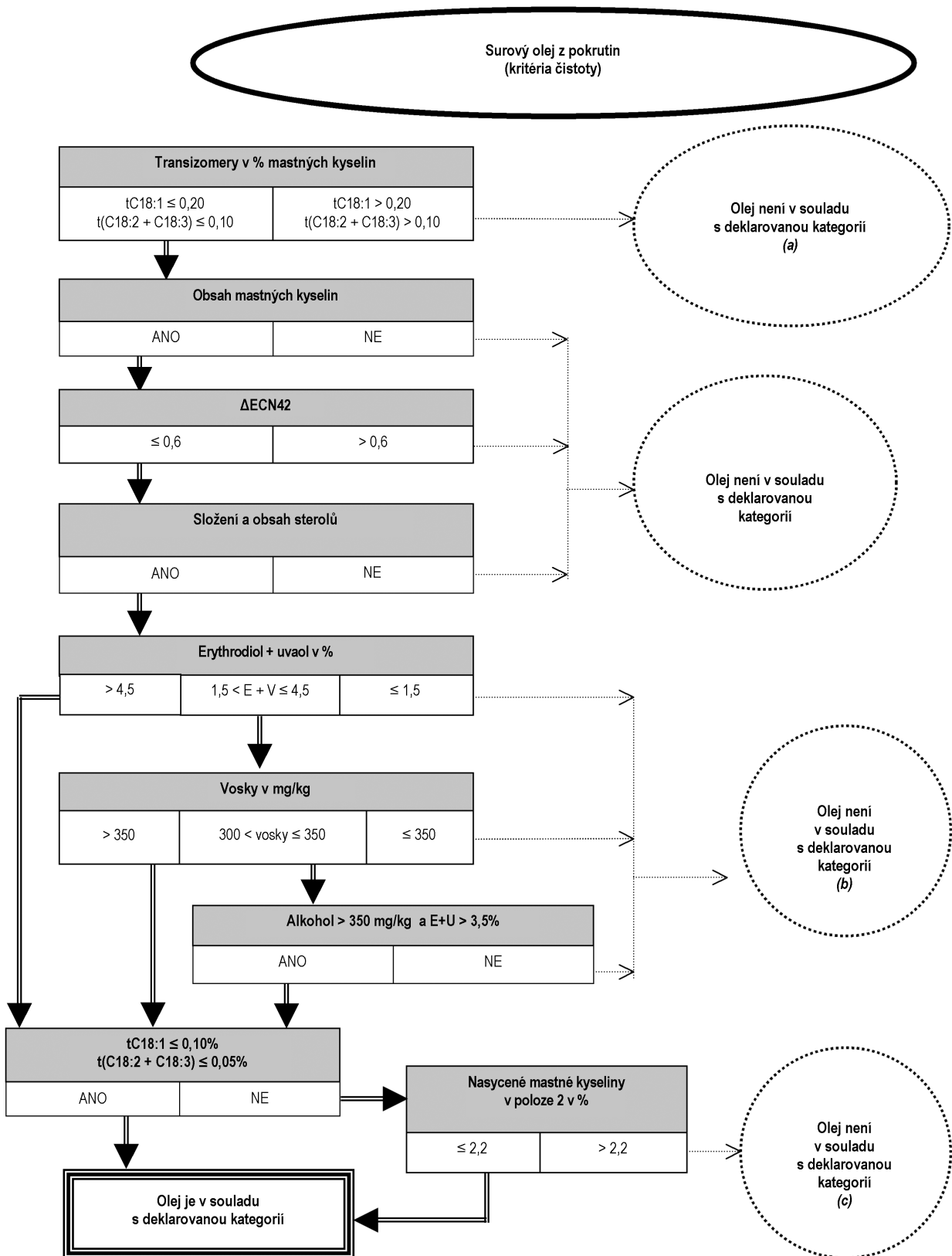
▼ M20

Tabulka 7



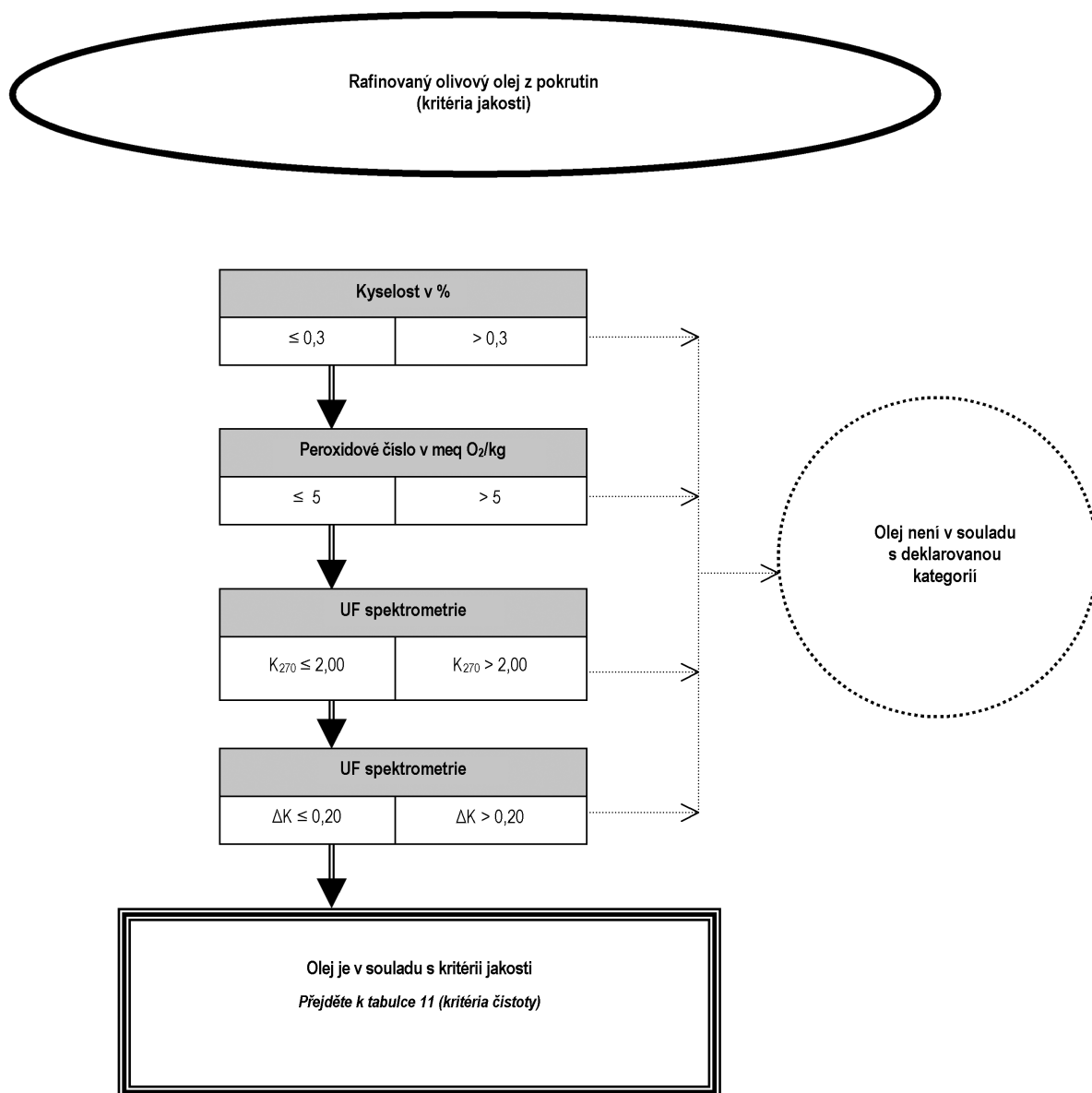
▼ M20

Tabulka 8



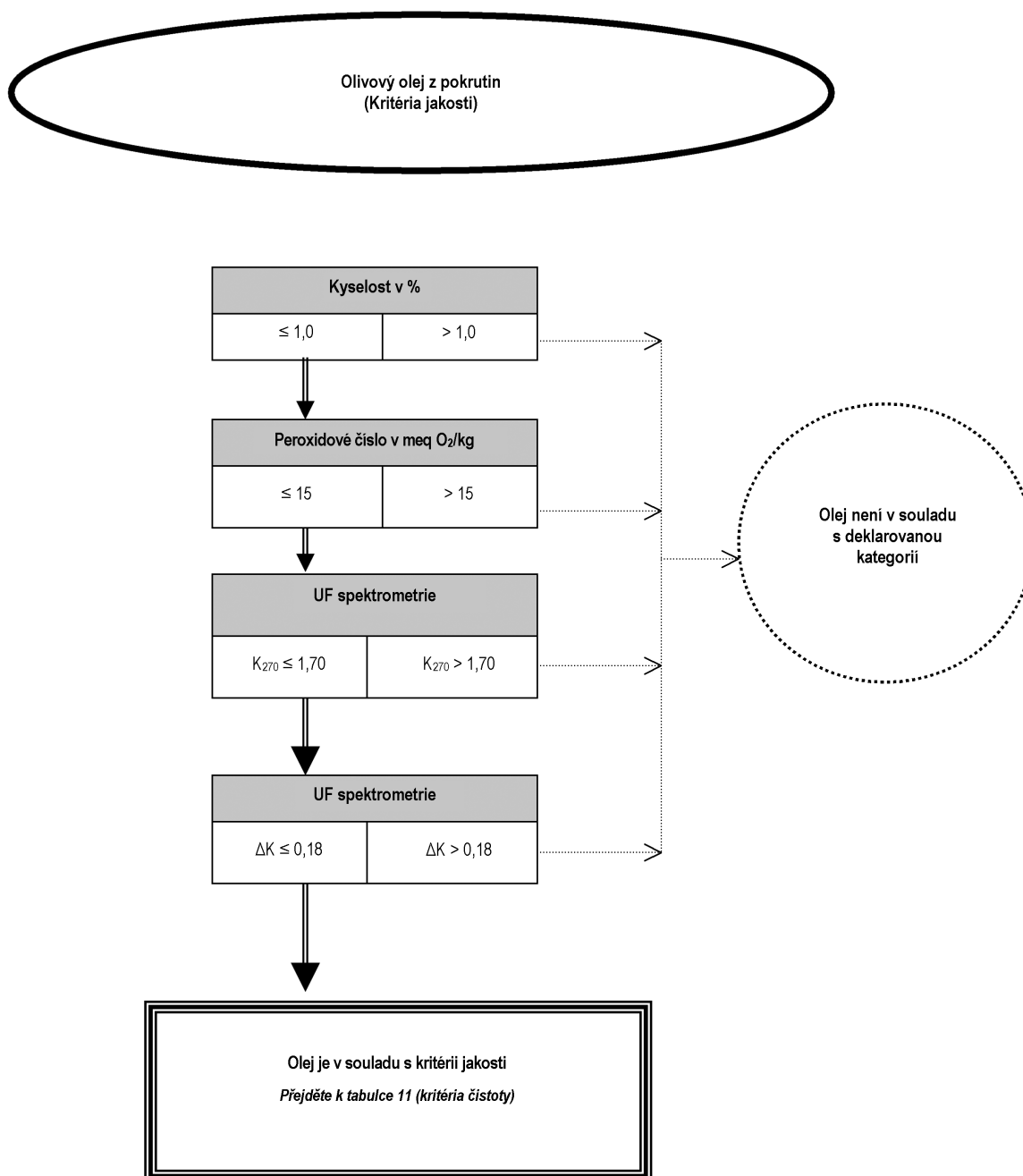
▼ **M20**

Tabulka 9



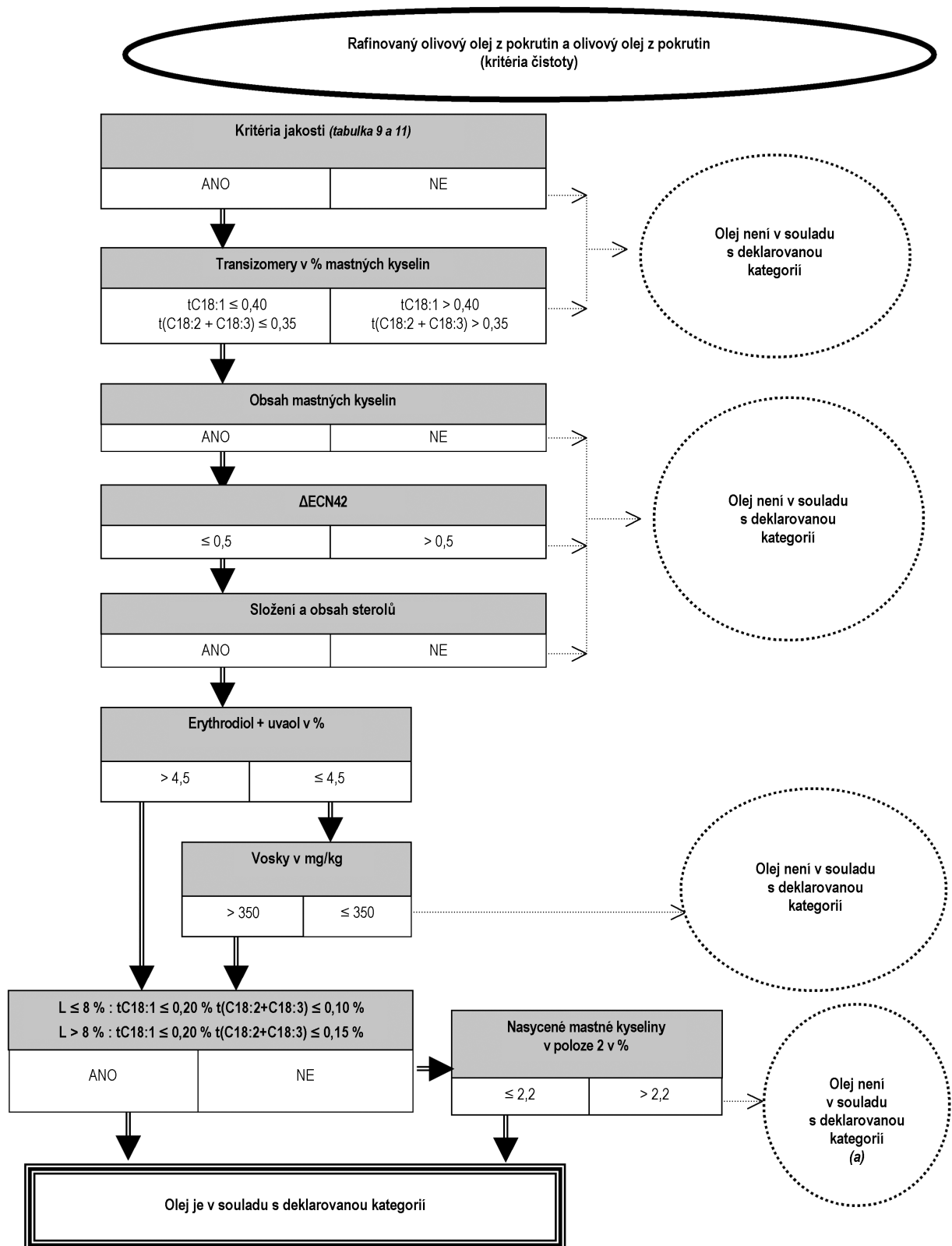
▼ **M20**

Tabulka 10



▼ M20

Tabulka 11



▼ **M20***DODATEK 1***Srovnávací tabulka mezi přílohami tohoto nařízení a analýzami uvedenými v rozhodovacím schématu**▼ **M21**

- | | | |
|------------|------------|---|
| – Kyselost | příloha II | Stanovení volných mastných kyselin, metoda za studena |
|------------|------------|---|

▼ **M20**

- | | | |
|---------------------------------|---------------|---|
| – Peroxidové číslo | příloha III | Stanovení peroxidového čísla |
| – UF spektrometrie | příloha IX | Spektrofotometrická analýza |
| – Organoleptické hodnocení | příloha XII | Organoleptické hodnocení panenského olivového oleje |
| – 3,5–stigmastadieny | příloha XVII | Metoda pro stanovení stigmastadienů v rostlinných olejích |
| – Transizomery mastných kyselin | příloha Xa a | Analýza methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií |
| | příloha Xb | Příprava methylesterů mastných kyselin |
| – Obsah mastných kyselin | příloha Xa i | Analýza methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií |
| | příloha Xb | Příprava methylesterů mastných kyselin |
| – Δ ECN42 | příloha XVIII | Metoda pro stanovení obsahu triglyceridů s ECN42 (rozdíl mezi hodnotou zjištěnou z HPLC a teoretickým výpočtem) |
| – Složení a obsah sterolů | příloha V | Stanovení obsahu a složení sterolů pomocí kapilární plynové chromatografie |
| – Erythrodiol a uvaol | příloha VI | Stanovení erythrodiolu a uvaolu |
| – Vosky | příloha IV | Stanovení obsahu vosku pomocí kapilární plynové chromatografie |
| – Alifatické alkoholy | příloha XIX | Stanovení obsahu a složení alifatických alkoholů pomocí kapilární plynové chromatografie |

▼ **M21**

- | | | |
|---------------------------------------|-------------|---|
| – Nasycené mastné kyseliny v poloze 2 | příloha VII | Stanovení procentního podílu 2-glyceril monopalmitátu |
|---------------------------------------|-------------|---|

▼ M20*DODATEK 2***Tabulka 1**

- a) Viz panenský nebo lampantový olivový olej (kritéria jakosti *tabulka 2* nebo kritéria jakosti a čistoty *tabulka 4*).
- b) Viz lampantový olivový olej (kritéria jakosti a čistoty *tabulka 4*).

Tabulka 2

- a) Viz lampantový olivový olej (kritéria jakosti a čistoty *tabulka 4*).
- b) Viz panenský olivový olej (kritéria jakosti *tabulka 1*).

Tabulka 3

- a) Přítomnost rafinovaného oleje (olivového nebo jiného).
- b) Přítomnost olivového oleje z pokrutin.

Tabulka 4

- a) Viz panenský olivový olej extra a panenský olivový olej (kritéria jakosti *tabulka 1 a tabulka 2*).
- b) Přítomnost rafinovaného oleje (olivového nebo jiného).
- c) Přítomnost olivového oleje z pokrutin.
- d) Přítomnost esterifikovaných olejů.

Tabulka 7

- a) Přítomnost olivového oleje z pokrutin.
- b) Přítomnost esterifikovaných olejů.

Tabulka 8

- a) Přítomnost rafinovaného oleje (olivového nebo jiného).
- b) Viz lampantový olivový olej (kritéria jakosti a čistoty *tabulka 4*).
- c) Přítomnost esterifikovaných olejů.

Tabulka 11

- a) Přítomnost esterifikovaných olejů

▼ B

PŘÍLOHA II

▼ M21STANOVENÍ VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN, METODA ZA
STUDENA**▼ B**

1. STANOVENÍ KYSELOSTI

Stanovení volných mastných kyselin v olivových olejích. Obsah volných mastných kyselin je vyjádřen jako kyselost vypočtená obvyklým způsobem.

1.1. **Podstata metody**

Vzorek se rozpustí ve směsi rozpouštědel. Přítomné volné mastné kyseliny se potom titrují ethanolickým roztokem hydroxidu draselného.

1.2. **Chemikálie**

Všechna činidla musí mít čistotu p. a., voda destilovaná nebo odpovídající čistoty.

1.2.1 Směs diethyletheru a 95 % ethanolu 1:1 (V/V).

Poznámka: diethylether je vysoce hořlavý a může vytvářet výbušné peroxidy. Při jeho používání je třeba dbát zvýšené opatrnosti.

Neutralizuje se těsně před použitím pomocí roztoku hydroxidu draselného (1.2.2) a přidá se 0,3 ml fenolftaleinového roztoku (1.2.3) na 100 ml směsi.

Poznámka: není-li možné použít diethylether, může se použít směsné rozpouštědlo obsahující ethanol a toluen. V případě potřeby může být ethanol nahrazen 2-propanolem.

1.2.2 Hydroxid draselný, titrační ethanolický roztok o koncentraci $c(\text{KOH})$ přibližně 0,1 mol/l, nebo v případě potřeby přibližně 0,5 mol/l.

Přesná koncentrace ethanolického roztoku hydroxidu draselného musí být známa a zkontrolována těsně před použitím. Použije se roztok připravený nejméně pět dnů před použitím a dekantovaný v láhvi z hnědého skla s gumovou zátkou. Roztok musí být bezbarvý nebo pouze slabě zbarvený.

Poznámka: stabilní bezbarvý roztok hydroxidu draselného je možné připravit takto: do varu se uvede 1 000 ml ethanolu s 8 g hydroxidu draselného a 0,5 g hliníkových hoblin a nechá se jednu hodinu vařit pod zpětným chladičem. Okamžitě se destiluje. V destilátu se rozpustí požadované množství hydroxidu draselného. Několik dnů se nechá stát a oddělí se čistá kapalina od usazeniny uhličitanu draselného.

Tento roztok je též možné připravit bez destilace takto: do 1 000 ml ethanolu se přidá 4 ml aluminium-butylátu a směs se nechá několik dní stát. Odsazená kapalina se slije a v ní se rozpustí požadované množství hydroxidu draselného. Roztok je připraven k použití.

1.2.3 Fenolftalein, roztok o koncentraci 10 g/l, v 95 % - 96 % ethanolu (V/V), nebo alkalická modř (v případě silně zbarvených tuků), roztok o koncentraci 20 g/l, v 95 % - 96 % ethanolu (V/V).

1.3 **Přístroje a pomůcky**

Obvyklé laboratorní přístroje a pomůcky, mj.:

▼ B

- 1.3.1 analytické váhy,
 1.3.2 Erlenmeyerova baňka na 250 ml,
 1.3.3 byreta na 10 ml s hodnotou dílku 0,05 ml.

1.4 Postup**1.4.1 Příprava vzorku na testování**

(Testování se provádí s filtrovaným vzorkem. Pokud celkový obsah vody a nečistot činí méně než 1 %, provede se testování s nefiltrovaným vzorkem.)

1.4.2 Odběr vzorku

Hmotnost vzorku se řídí podle očekávaného obsahu volných mastných kyselin (podle údajů v dále uvedené tabulce).

Očekávaný obsah volných mastných kyselin	Hmotnost vzorku (g)	Přesnost vážení na (g)
< 1	20	0,05
1 až 4	10	0,02
4 až 15	2,5	0,01
15 až 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Vzorek se naváží v Erlenmeyerově baňce (1.3.2).

1.4.3 Stanovení

Vzorek (1.4.2) se rozpustí v 50 až 150 ml předem neutralizované směsi diethyletheru a ethanolu (1.2.1).

Titruje se za současného míchání roztokem hydroxidu draselného o koncentraci přibližně 0,1 mol/l (1.2.2) (viz poznámka 2), dokud nedojde k barevné změně indikátoru (růžová zbarvení fenolftaleinu musí trvat nejméně 10 sekund).

Poznámky: 1. Pokud přidané množství vody nevyvolá rozložení fází, lze titrační ethanolický roztok hydroxidu draselného (1.2.2) nahradit vodným roztokem hydroxidu draselného nebo sodného.

Poznámky: 2. Pokud je k titraci potřeba více než 10 ml roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 0,1 mol/l, je nutno použít roztok o koncentraci 0,5 mol/l.

Poznámky: 3. Pokud se během titrace roztok zakalí, je nutno přidat dostatečné množství rozpouštědel (1.2.1), aby roztok byl opět čirý.

1.5 Výpočet obsahu volných mastných kyselin vyjádřených jako procento kyseliny olejové

Obsah volných mastných kyselin v % hmotnostních se vypočítá podle vzorce:

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

▼B

kde

V = spotřeba titračního roztoku hydroxidu draselného v ml;

c = přesná koncentrace roztoku hydroxidu draselného v mol/l;

M = molární hmotnost v g na mol kyseliny použité pro výpočet (= 282);

m = hmotnost vzorku v g.

Za výsledek se považuje aritmetický průměr ►**M6** ze dvou stanovení ◀.

▼B*PŘÍLOHA III***STANOVENÍ PEROXIDOVÉHO ČÍSLA****1. PŘEDMĚT**

tato metoda popisuje postup stanovení peroxidového čísla v olejích a tucích.

2. OBLAST POUŽITÍ

tato metoda platí pro živočišné a rostlinné oleje a tuky.

3. DEFINICE

Peroxidové číslo je množství těchto látek ve vzorku, vyjádřené v milimolech aktivního kyslíku na kg, které oxidují jodid draselný za popsaných pracovních podmínek.

4. PODSTATA

Reakce vzorku s jodidem draselným v roztoku kyseliny octové a chloroformu. Titrace uvolněného jodu standardizovaným roztokem thio-síranu sodného.

5. PŘÍSTROJE

Všechna zařízení musí být zbavena redukčních a oxidačních látek.

Poznámka: zábrusy nesmí být mazány tukem.

5.1 Skleněná váženka na 3 ml.**5.2 Baňky na 250 ml se zábrusy, předem vysušené a naplněné čistým, suchým inertním plynem (dusík, nebo lépe oxid uhličitý).****5.3 Byreta na 25 nebo 50 ml, s hodnotou dílku 0,1 ml.****6. CHEMIKÁLIE****6.1 Chloroform čistoty p. a., zbavený kyslíku probubláváním proudem suchého inertního plynu.****6.2 Ledová kyselina octová čistoty p. a., zbavená kyslíku probubláváním proudem suchého inertního plynu.****6.3 Jodid draselný, nasycený vodný roztok, čerstvě připravený, zbavený jodu a jodičnanů.****6.4 Thiosíran sodný, vodný roztok o koncentraci přesně 0,01 nebo 0,002 mol/l, připravený těsně před použitím.****6.5 Škrobový roztok, vodní disperze 10 g/l, čerstvě připravený z přírodního rozpustného škrobu.****7. VZOREK**

Vzorek je nutno odebrat a skladovat v temnu a chladu ve zcela naplněném skleněném obalu, hermeticky uzavřeném zabroušenou skleněnou, nebo korkovou zátkou.

▼B

8. POSTUP

Stanovení musí být prováděno v rozptýleném denním světle, nebo při umělém osvětlení. Vzorek se naváží ve skleněné váženke (5.1) nebo v baňce (5.2) s přesností na 0,001 g s ohledem na očekávaná peroxidové čísla podle dále uvedené tabulky:

Očekávané peroxidové číslo (meq O ₂ /kg)	Hmotnost zkušební vzorku (g)
0 až 12	5,0 až 2,0
12 až 20	2,0 až 1,2
20 až 30	1,2 až 0,8
30 až 50	0,8 až 0,5
50 až 90	0,5 až 0,3

Z baňky (5.2) se vyjme zátka a vloží se do ní váženka obsahující vzorek. Přidá se 10 ml chloroformu (6.1). Vzorek se rychle rozpustí zamícháním. Přidá se 15 ml kyseliny octové (6.2) a potom 1 ml roztoku jodidu draselného (6.3). Baňka se ihned uzavře, 1 minutu protřepává a nechá se stát přesně 5 minut v temnu při teplotě 15 °C a 25 °C.

Přidá se přibližně 75 ml destilované vody. Uvolněný jod se po přidavku škrobového roztoku (6.5) jako indikátoru za silného protřepávání titruje roztokem thiosíranu sodného (6.4) při použití koncentrace 0,002 mol/l roztoku pro předpokládané peroxidové číslo do 12, nebo roztokem o koncentraci 0,01 mol/l pro předpokládané peroxidové číslo větší než 12.

Z jednoho analytického vzorku se provedou dvě stanovení.

Spolu s vlastním stanovením se provádí slepý pokus. Jestliže výsledky slepého pokusu přesáhnou 0,05 ml roztoku thiosíranu sodného o koncentraci 0,01 mol/l (6.4), je nutno vyměnit znečištěná činidla.

9. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

Peroxidové číslo (PV) vyjádřené v miliekvivalentech aktivního kyslíku na kg se vypočítá podle vzorce:

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

V = objem roztoku thiosíranu sodného (6.4), použitého pro stanovení, korigovaný s ohledem na slepý pokus;

T = přesná molarita použitého roztoku thiosíranu sodného (6.4);

m = hmotnost zkušební vzorku v g.

Za výsledek se považuje aritmetický průměr dvou stanovení.

▼ **M21***PŘÍLOHA IV***STANOVENÍ OBSAHU VOSKU POMOCÍ KAPILÁRNÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE****1. PŘEDMĚT**

Tato metoda popisuje postup stanovení obsahu vosku v olivových olejích. Vosky se dělí podle počtu atomů uhlíku. Tuto metodu lze použít zejména k rozlišení mezi olivovým olejem získaným lisováním a extrakcí (olivový olej z pokrutin).

2. PODSTATA METODY

K tuku nebo oleji se přimísí vhodný vnitřní standard a poté se provádí chromatografická frakční destilace na hydratované silikagelové koloně. Získaná frakce eluovaná nejprve při testovacích podmínkách (jejíž polarita je menší než polarita triglyceridů) se přímo analyzuje pomocí kapilární plynové chromatografie.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY**3.1 Kónická 25ml baňka.****3.2 Skleněná chromatografická plynová kolona o vnitřním průměru 15 mm a délce 30 až 40 cm vybavená ventilem.****3.3 Plynový chromatograf vhodný pro použití s kapilární kolonou a vybavený přímým vstřikováním, obsahující:****3.3.1 Termostatickou komoru pro kolony vybavenou programátorem teploty.****3.3.2 Studené nástřikové zařízení pro přímé zavádění do kolony.****3.3.3 Plameno-ionizační detekční čidlo a konverzní zesilovač.****3.3.4 Integrátor se zapisovačem, vhodný pro provoz s konverzním zesilovačem (3.3.3), s rychlostí odezvy nižší než 1 sekundu a s nastavitelnou rychlostí posunu papíru. (Lze též použít informační systémy, které umožňují získávání dat z plynové chromatografie pomocí PC.)****3.3.5 Kapilární kolona, ze skla nebo taveného křemene, dlouhá 8 až 12 m s vnitřním průměrem 0,25 až 0,32 mm, obsahující kapalnou fázi, o jednotné tloušťce 0,10 až 0,30 μm . (Kapalná fáze SE 52 nebo SE 54 vhodné k použití v obchodu.)****3.4 Mikrostřikačka na 10 μl pro přímý vstřik do kolony opatřená tvrzenou jehlou.****3.5 Elektrický vibrátor.****3.6 Rotační odpařovač.****3.7 Muflová pec.****3.8 Analytické váhy s přesností měření $\pm 0,1$ mg.****3.9 Běžné laboratorní skleněné nádoby.****4. REAKČNÍ ČINIDLA****4.1 Silikagel s velikostí zrna od 60 do 200 μm .**

Silikagel se umístí alespoň na čtyři hodiny do pece o teplotě 500 °C. Nechá se ochladit a přidají se 2 % vody v poměru k odebranému množství silikagelu. Řádným protřepáním se směs homogenizuje. Před použitím se ponechá nejméně 12 hodin ve tmě.

▼ M21

- 4.2 n-hexan pro chromatografii.
- 4.3 Diethylether pro chromatografii.
- 4.4 n-heptan pro chromatografii.
- 4.5 Standardní roztok 0,1 % (m/V) laurylarachidátu v hexanu (vnitřní standard). (*Lze též použít palmityl palmitát a myristyl stearát.*)
- 4.5.1 Sudan 1 (1-fenyl-azo-2-naftol).
- 4.6 Nosný plyn: vodík nebo čisté helium pro plynovou chromatografii.
- 4.7 Pomocné plyny:
- vodík, čistý pro plynovou chromatografii,
 - vzduch, čistý pro plynovou chromatografii.

5. POSTUP**5.1 Příprava chromatografické kolony**

Provede se suspenze 15 g silikagelu (4.1) v n-hexanu (4.2) a zavede se do kolony (3.2). Po spontánní sedimentaci se tato dokončí pomocí elektrického vibrátoru (3.5), aby byla chromatografická vrstva co nejhomogennější. Provede se perkolace 30 ml n-hexanu za účelem odstranění případných nečistot. Pomocí vah (3.8) se naváží přesně 500 mg vzorku do baňky (3.1) a přidá se vhodné množství vnitřního standardu (4.5) v závislosti na předpokládaném obsahu vosku. Např. 0,1 mg laurylu arachidátu v případě olivového oleje a 0,25 až 0,5 mg v případě olivového oleje z pokrutin. Získaný vzorek se za pomoci dvou dávek 2 ml n-hexanu (4.2) převede do chromatografické kolony.

Umožní se, aby hladina rozpouštědla poklesla tak, aby byla 1 mm nad horní úroveň absorbentu, a poté se provede perkolace 70 ml doplňkového n-hexanu za účelem odstranění n-alkanů, které jsou přirozeně přítomny. Poté se zahájí chromatografické eluování, odejme se 180 ml směsi n-hexanu/diethyletheru v poměru 99:1 při průtoku přibližně 15 kapek za 10 sekund. Eluování vzorku se musí provést při teplotě okolí $22\text{ °C} \pm 4$.

Poznámky: — Směs n-hexanu s diethyletherem v poměru 99:1 se musí připravovat každý den.

- Aby bylo možno vizuálně kontrolovat správné eluování vosků, je možno do roztoku vzorku přidat 100 μl 1 % Sudanu v eluovací směsi. Jelikož má barvivo přechodnou vazbu mezi vosky a triglyceridy, je třeba eluci přerušit, jakmile zabarvení dosáhne spodní části chromatografické kolony, neboť všechny vosky byly eluovány.

Získaná frakce se usuší v rotačním odpařovači (3.6), až je téměř všechno rozpouštědlo odstraněno. Poslední 2 ml rozpouštědla se odstraní za pomoci slabého proudu dusíku; poté se přidá 2–4 ml n-heptanu.

5.2 Analýza plynovou chromatografií**5.2.1 Přípravné práce**

Kolona se spojí s plynovým chromatografem (3.3), vstupní port se připojí ke kolonovému systému (*on-column system*) a výstupní port k detekčnímu čidlu. Poté se plynový chromatograf překontroluje (těsnost plynových vedení, funkce detekčního čidla a záznamníku atd.).

▼ **M21**

Kapilární kolony, které mají být použity poprvé, je nutno nejprve kondicionovat. Kapilární kolonou se nechá protékat malé množství nosného plynu, poté se zapne plynový chromatograf a nechá se postupně zahřívat. Postupně se zahřívá, dokud není zhruba po 4 hodinách dosaženo teploty 350 °C. Tato teplota se udržuje nejméně dvě hodiny a poté se provede regulace pracovních podmínek (regulace průtoku plynu, zapálení plamene, připojení elektronického zapisovače (3.3.4), nastavení teploty kolonové komory, detekčního činidla atd.) a signál se nastaví na citlivost, která činí nejméně dvojnásobek nejvyšší úrovně uvažované pro provedení analýzy. Základní linie záznamu musí být rovná, bez jakýchkoli piků nebo driftů.

Záporné drifty jsou známkou nedokonalé těsnosti spojů kolony, zatímco kladné svědčí o nedostatečné kondicionaci kolony.

5.2.2 *Výběr pracovních podmínek*

Pracovní podmínky, které je třeba všeobecně dodržovat, jsou tyto:

— teplota kolony:

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

— teplota detekčního činidla: 350 °C,

— množství nastříknuté látky: 1 µl roztoku n-heptanu (2–4 ml),

— nosný plyn: optimální lineární rychlost helia nebo vodíku u vybraného plynu (viz dodatek),

— citlivost přístroje: má odpovídat níže uvedeným podmínkám:

Tyto podmínky mohou být upraveny podle charakteristik kolony a plynového chromatografu s cílem oddělit všechny vosky, dosáhnout dostatečného rozpuštění piků (viz obrázek) a retenčního času vnitřního standardu C₃₂, který musí být 18 ± 3 minuty. Nejreprezentativnější pík vosku musí dosáhnout nejméně 60 % z plného rozsahu.

Parametry pro integraci piků se nastaví tak, aby došlo ke správnému vyhodnocení ploch uvažovaných piků.

Poznámka: Vzhledem k tomu, že konečná teplota je vysoká, připouští se kladný drift, který nesmí přesáhnout 10 % z plného rozsahu.

5.3 **Provedení analýzy**

Do mikrostříkačky na 10 µl se natáhne 1 µl roztoku; píst mikrostříkačky se povytáhne tak, aby se vyprázdnila jehla. Jehla se zavede přes septum vstříkové komory a přibližně po jedné nebo dvou sekundách se rychle nastříkne roztok; přibližně po pěti sekundách se jehla pomalu vytáhne.

Zaznamenávání je prováděno, dokud vosky nejsou zcela eluovány.

▼ M21

Základní linie záznamu musí vždy odpovídat požadavkům.

5.4 Identifikace píků

Identifikace jednotlivých píků se provádí podle retenčních časů a porovnáním se směsí vosků, jejichž retenční časy jsou známy a které byly analyzovány za stejných podmínek.

Chromatogram vosků panenského olivového oleje je znázorněn na obrázku.

5.5 Kvantitativní vyhodnocení

Pomocí integrátoru se vypočítají plochy píků odpovídajících vnitřnímu standardu a alifatickým esterům C₄₀ až C₄₆.

Obsah vosku jednotlivých esterů vyjádřený v mg/kg tukové látky se vypočítá podle vzorce:

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

kde:

A_x = plocha píku každého esteru v milimetrech čtverečních;

A_s = plocha píku vnitřního standardu v milimetrech čtverečních;

m_s = hmotnost přidaného vnitřního standardu v miligramech;

m = hmotnost vzorku použitého pro stanovení v gramech.

6. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

Uvádí se souhrn obsahů jednotlivých vosků C₄₀ až C₄₆ v mg/kg tukové látky (ppm).

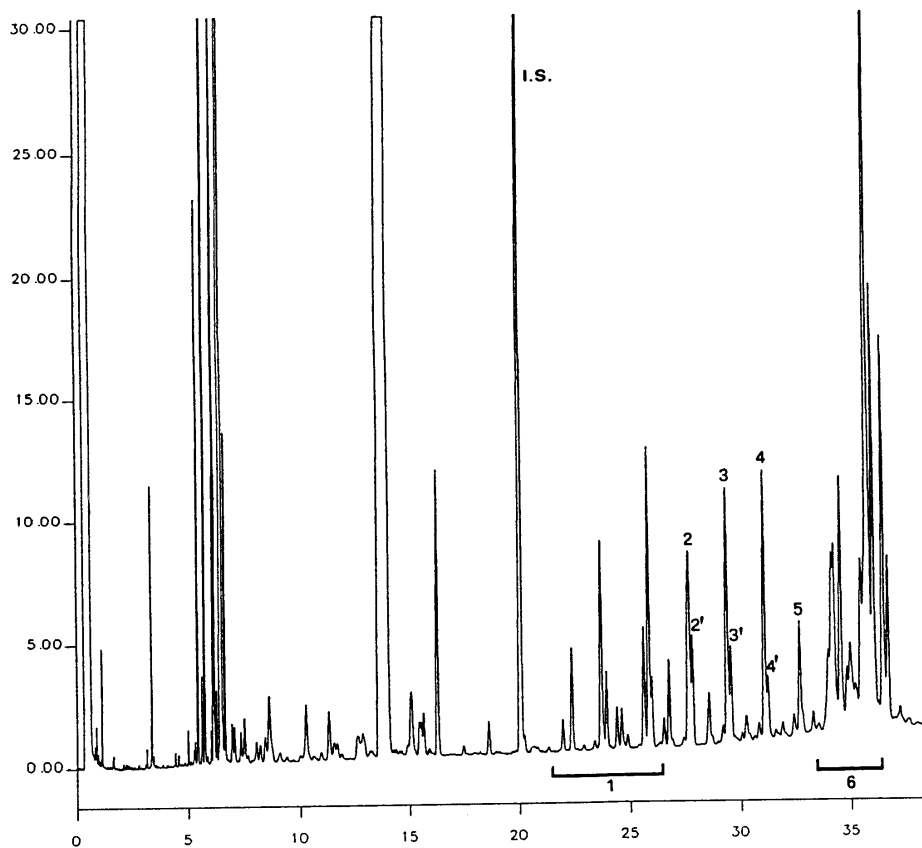
Poznámka: Sloučeniny, které je třeba kvantifikovat, se stanoví vzhledem k píkům esterů s počtem uhlíků mezi C₄₀ a C₄₆ podle příkladu chromatogramu vosků olivového oleje uvedeného na následujícím obrázku. Pokud se ester C₄₆ objeví dvakrát, doporučuje se pro jeho identifikaci provést analýzu frakce vosků olivového oleje z pokrutin, v níž je pík C₄₆ snadno rozpoznatelný, jelikož jasně převažuje.

Výsledky se vyjádří s přesností na jedno desetinné místo.

▼M21

Obrázek

Chromatogram vosků olivového oleje (1)



Vysvětlivky:

- I.S. = Lauryl arachidátu;
 1 = Estery diterpenu;
 2 + 2' = Estery C₄₀;
 3 + 3' = Estery C₄₂;
 4 + 4' = Estery C₄₄;
 5 = Estery C₄₆;
 6 = Estery sterolů a triterpenický alkohol.

(1) Po eluování esterů sterolů musí být chromatografická linie bez významných píků (triglyceridů).

▼ M21*DODATEK***Stanovení lineární rychlosti plynu**

Do plynového chromatografu nastaveného na normální pracovní podmínky se vstříkne 1 až 3 μl methanu nebo propanu. Změří se doba průchodu plynu kolonou od počátku vstříku do okamžiku eluce píků (t_M).

Lineární rychlost proudění v cm/s je dána poměrem L/t_M , kde L je délka kolony v cm a (t_M) je čas změřený v sekundách.

▼B*PŘÍLOHA V***STANOVENÍ SLOŽENÍ A OBSAHU STEROLŮ POMOCÍ KAPILÁRNÍ
PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE**

1. PŘEDMĚT
Tato metoda popisuje postup stanovení obsahu a složení sterolů v tukové látce.
2. PODSTATA METODY
Zmýdelnění tukové látky, k níž je přidán β -cholestanol jako vnitřní standard, pomocí ethanolickeho roztoku hydroxidu draselneho a extrakce nezmýdelnitelnych latek pomocí diethyletheru.

Pomocí chromatografie na bazické silikagelové desce se z nezmýdelnitelneho extraktu oddělí sterolová frakce. Steroly oddělené ze silikagelu se převedou na trimethylsilylether a analyzují pomocí kapilární plynové chromatografie.
3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
 - 3.1 Baňka na 250 ml vybavená zpětným chladičem se zábrusem.
 - 3.2 Dělicí nálevky na 500 ml.
 - 3.3 Baňky na 250 ml.
 - 3.4 Kompletní zařízení pro tenkovrstvou chromatografii se skleněnými deskami o rozměrech 20 × 20 cm.
 - 3.5 Ultrafialová lampa s vlnovou délkou 366 nebo 254 nm.
 - 3.6 Mikrostřikačky na 100 μ l a 500 μ l.
 - 3.7 Filtrační nálevka ze sintrovaného skla pórovitou fritou G3 (pórovitost 15 až 40 μ m) o průměru přibližně 2 cm a výšce přibližně 5 cm, vybavená uzávěrem pro vakuovou filtraci a s vnějším zábrusem 12/21.
 - 3.8 Odsávací baňka na 50 ml s vnitřním zábrusem 12/21 pro použití s filtrační nálevkou (3.7).
 - 3.9 Zkumavka na 10 ml s kónickým dnem a zátkou.
 - 3.10 Plynový chromatograf vhodný pro použití s kapilární kolonou a opatřený dělicím systémem složeným:
 - 3.10.1 z termostatické kolonové komory, nastavitelné na požadovanou teplotu s přesností ± 1 °C;
 - 3.10.2 z odpařovací jednotky s termostatem (vstřikové komory) s povlakem ze silanizovaného skla,
 - 3.10.3 z plameno-ionizačního detektoru se zesilovačem,
 - 3.10.4 z integrátoru se zapisovačem vhodného pro provoz se zesilovačem (3.10.3), s dobou odezvy nejvýše jednu sekundu a s proměnnou rychlostí papíru.
 - 3.11 Kapilární kolona ze skla nebo taveného křemene dlouhá 20 až 30 m, s vnitřním průměrem 0,25 až 0,32 mm, obsahující kapalnou fázi SE-52 nebo SE-54 nebo ekvivalentní, o tloušťce filmu 0,10 až 0,30 μ m.
 - 3.12 Mikrostřikačka pro plynovou chromatografii na 10 μ l s tvrzenou jehlou.

▼ B

4. CHEMIKÁLIE
- 4.1 Hydroxid draselný ve formě ethanolického roztoku o koncentraci přibližně 2 mol/l: 130 g přibližně 85 % hydroxidu draselného se za současného chlazení rozpustí ve 200 ml destilované vody a doplní se do jednoho litru ethanolem. Tento roztok je nutno uchovávat v dobře uzavřené skleněné láhvi z tmavého skla.
- 4.2 Diethylether čistoty p. a.
- 4.3 Bezvodý síran sodný čistoty p. a.
- 4.4 Silikagelem potažené skleněné desky bez fluorescenčního indikátoru o tloušťce 0,25 mm (obchodně dostupné).
- 4.5 Hydroxid draselný ve formě ethanolického roztoku o koncentraci 0,2 mol/l: 13 g hydroxidu draselného se rozpustí ve 20 ml destilované vody a doplní se do jednoho litru ethanolem.
- 4.6 Benzen pro chromatografii (viz 5.2.2).
- 4.7 Aceton pro chromatografii (viz 5.2.2).
- 4.8 Hexan pro chromatografii (viz 5.2.2).
- 4.9 Diethylether pro chromatografii (viz 5.2.2).
- 4.10 Chloroform čistoty p. a.
- 4.11 Referenční roztok pro tenkovrstvou chromatografii: ► **M6** 2 % ◀ roztok cholesterolu nebo fytosterolu v chloroformu.
- 4.12 0,2 % ethanolický roztok 2,7-dichlor-fluoresceinu, mírně zásaditý přidáním několika kapek alkoholového roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 2 mol/l.
- 4.13 Bezvodý pyridin pro chromatografii.
- 4.14 Hexamethyl-disilazan.
- 4.15 Trimethyl-chlorsilan.
- 4.16 Referenční roztoky sterol(trimethylsilyl)etherů. Připraví se z čistých sterolů nebo ze směsi sterolů získaných z olejů, které je obsahují, těsně před použitím.
- 4.17 0,2 % roztok α -cholestanolu v chloroformu (m/V) (vnitřní standard).
- 4.18 Nosné plyny: vodík nebo helium, čisté pro plynovou chromatografii.
- 4.19 Pomocné plyny: vodík a vzduch, čisté pro plynovou chromatografii.
5. POSTUP
- 5.1 Příprava nezmýdelnitelných látek
- 5.1.1 Pomocí mikrostříkačky na 500 μ l se do baňky na 250 ml dá pro účely analýzy 0,2 % roztok α -cholestanolu v chloroformu (4.17), obsahující množství cholestanolu rovnající se přibližně 10 % obsahu sterolu v části vzorku, která má být odebrána za účelem analýzy. Například při analýze oleje se na 5 g vzorku přidá 500 μ l 0,2 % roztoku α -cholestanolu, a 1 500 μ l při analýze ► **M6** ————— ◀ olivového oleje z pokrutin.

V dusíku se vzorek odpaří do sucha a do stejné baňky se naváží přesně 5 g vysušeného přefiltrovaného vzorku.

▼ B

►**M6** Oleje ◀ obsahující větší množství cholesterolu mohou vykazovat pík s retenčním časem shodným s cholestanolem. Pokud k tomu dojde, musí být sterolová frakce analyzována jednou s vnitřním standardem, a jednou bez něj. ►**M6** Namísto cholestanolu je možné použít také betulinol. ◀

5.1.2 Přidá se 50 ml ethanolickeho roztoku hydroxidu draselneho o koncentraci 2 mol/l, pripoji se zpětný chladič a zahřeje se do mírného varu na parní lázni za nepřetržitého míchání během zahřívání, dokud nedojde ke zmydelnění (roztok se vyčeří). V zahřívání se pokračuje dalších 20 minut a poté se přes chladič přidá 50 ml destilované vody. Chladič se pak odpojí a baňka se vychladí na teplotu přibližně 30 °C.

5.1.3 Obsah baňky se kvantitativně převede do dělicí nálevky na 500ml a propláchně 2 x 25 ml destilované vody. Přidá se přibližně 80 ml diethyletheru, vše se protřepe po dobu 30 sekund a nechá se odstát (poznámka 1).

Spodní vodná fáze se převede do druhé nálevky. Stejným způsobem se provedou další dvě extrakce vodné fáze vždy s použitím 60 až 70 ml diethyletheru.

Poznámka 1 Emulze je možné odstranit přidáním malých množství ethanolu nebo methanolu formou postříku.

5.1.4 Diethyletherové extrakty se smíchají v dělicí nálevce a promyjí destilovanou vodou (50 ml v jedné dávce), dokud promývací voda nevykáže neutrální reakci.

Odstraní se vodná fáze, etherová fáze se vysuší bezvodým síranem sodným a přefiltruje se do předem zvážené baňky na 250 ml, přičemž nálevka a filtr se promyjí malými množstvími diethyletheru, které se přidá k celkovému množství.

5.1.5 Ether se pozvolným zahříváním odpařuje, až jej zbude jen několik ml, a zbytek se vysuší v mírném vakuu nebo pod proudem dusíku. Vysušení se dokončí v sušárně při teplotě 100 °C po dobu přibližně 15 minut a zbytek po se zváží po vychlazení v exsikátoru.

5.2 Separace sterolové frakce

5.2.1 Příprava bazických desek. Silikagelové desky (4.4) se na 10 sekund zcela ponoří do ethanolickeho roztoku hydroxidu draselneho o koncentraci 2 mol/l (4.5), poté se nechají dvě hodiny sušit v digestoři a nakonec na jednu hodinu umístí do sušárny vyhřáté na 100 °C.

Desky se vyjmou ze sušárny a až do okamžiku použití uloží do exsikátoru s chloridem vápenatým. Takto upravené desky musí být použity během 15 dnů.

Poznámka 2 Jsou-li pro separaci alkoholové frakce použity bazické silikagelové desky, není nutné upravovat nezmýdelnitelné látky pomocí AIO (oxidu hlinitého). Dojde tak k zadržení všech kyselých sloučenin (mastných kyselin apod.) na počátku, a tím se zřetelně oddělí pásmo sterolů od pásma alifatických a triterpenických alkoholů.

▼ B

- 5.2.2 Vyuvíjecí komora se naplní roztokem benzenu a acetonu v poměru 95: 5 (V/V) do výšky přibližně 1 cm. Jinak je možné použít směs hexanu a diethyletheru 65:35 (V/V). Vyuvíjecí komora se uzavře a nejméně půl hodiny ponechá v klidu, aby se mohla vytvořit rovnováha mezi parami a kapalinou. Na vnitřní povrch vyuvíjecí komory je možné připojit proužky filtračního papíru namočené v eluční směsi za účelem zkrácení doby vyvolávání přibližně o jednu třetinu a dosílení stejnoměrnější, pravidelní eluce složek.

Poznámka 3 Vyuvíjecí roztok musí být pro každou analýzu vyměněn, aby bylo dosaženo reprodukovatelných podmínek vyvíjení.

- 5.2.3 Připraví se 5 % roztok nezmýdelnitelných látek (5.1.5) v chloroformu a 300 μ l tohoto roztoku se pomocí mikrostříkačky na 100 μ l nastříkne jako co nejrovnoměrnější a co nejtenčí pruh na tenkovrstvou desku přibližně 2 cm od dolního okraje desky. Ve stejné úrovni se nanese 2 až 3 μ l referenčního roztoku sterolů (4.11) za účelem stanovení sterolového pásma po dokončení vyvíjení.

- 5.2.4 Deska se umístí do vyuvíjecí komory uvedené v odstavci 5.2.2. Teplota se udržuje mezi 15 a 20 °C. Vyuvíjecí komora se okamžitě uzavře a vzorek se nechá eluovat, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne přibližně 1 cm od horního okraje desky. Deska se poté vyjme z vyuvíjecí komory a rozpouštědlo se nechá odpařit pod proudem horkého vzduchu nebo se deska na chvíli nechá v digestoři.

- 5.2.5 Deska se lehce a rovnoměrně postříká roztokem 2,7-dichlor-fluoresceinu a pozoruje se pod ultrafialovým zářením. Sterolové pásmo se stanoví porovnáním skvm vytvořených referenčním roztokem. Obrisy pásma podél okrajů fluorescence se vyznačí černým značkovačem.

- 5.2.6 Silikagel se z označené oblasti seškrábe pomocí kovové špachtle. Odebraná hmota se rozmělní na malé části a převede do filtrační nálevky (3.7). Přidá se 10 ml horkého chloroformu. Obsah se důkladně promíchá kovovou sítěrkou a vakuově přefiltruje. Filtrát se shromáždí v baňce, připojené na filtrační nálevku.

Zbytek v nálevce se propláchne 3 \times 10 ml diethyletheru. Filtrát se přitom sbírá do stejné baňky připojené k nálevce. Filtrát se odpaří na objem přibližně 4 až 5 ml a zbytkový roztok se převede do předem zvážené zkumavky na 10 ml (3.9). Zkumavka se vysuší lampou pod mírným proudem dusíku. Zbytek se znovu rozpustí několika kapkami acetonu, opět vysuší a na deset minut vloží do sušárny vyhřáté na 105 °C, vyjme, vychladí v exsikátoru a zváží.

Zbytek ve zkumavce je tvořen sterolovou frakcí.

- 5.3 Příprava trimethylsilyletherů

- 5.3.1 Do zkumavky obsahující sterolovou frakci se přidá činidlo pro silylaci tvořené směsí pyridinu, hexamethyl-disilazanu a trimethyl-chlorsilanu v poměru 9:3:1 (V/V/V) (poznámka 4) v množství 50 μ l na každý mg sterolů. Přitom je nutné zabránit jakékoli absorpci vlhkosti (poznámka 5).

Poznámka 4 Roztoky připravené k použití jsou obchodně dostupné: silanizační činidla, jako například N, O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid + 1 % trimethyl-chlor-silan pro smíchání se stejným objemem bezvodého pyridinu.

▼ B

- 5.3.2 Zkumavka se uzavře a pečlivě protřepe bez převrácení, dokud se steroly nerozpustí. Poté se nechá v klidu nejméně 15 minut při laboratorní teplotě a potom několik minut odstředí. Čirý roztok je připraven pro plynovou chromatografickou analýzu.

Poznámka 5 Vznik slabé opalescence je normální a není nijak rušivý. Tvorba bílých vloček nebo existence růžového zabarvení jsou známkami přítomné vlhkosti nebo degradace činidla. V tomto případě je třeba zkoušku opakovat.

5.4 *Analýza plynovou chromatografií*

5.4.1 Přípravné operace a kondicionace kapilární kolony

- 5.4.1.1 Kapilární kolona se připojí k plynovému chromatografu tak, že začátek kolony se připojí k odpařovací jednotce, která je spojena s oddělovacím systémem. Konec kolony se připojí k detektoru.

Provede se kompletní kontrola plynového chromatografu (těsnost plynových spojovacích prvků, účinnost detektoru, účinnost oddělovacího a zapisovacího systému atd.).

- 5.4.1.2 Kapilární kolony, které mají být použity poprvé, je nutno nejprve kondicionovat. Kapilární kolonou se nechá protékat malé množství nosného plynu, poté se zapne plynový chromatograf a nechá se postupně zahřívát, dokud není dosaženo teploty nejméně o 20 °C vyšší, než je laboratorní teplota (viz poznámka 6). Tato teplota se udržuje nejméně dvě hodiny a poté se systém převede do pracovních podmínek (regulace průtoku plynu, oddělování, zapálení plamene, připojení elektronického zapisovače, nastavení teploty kolonové komory, detektoru, injektoru atd.) a signál se nastaví na citlivost, která činí nejméně dvojnásobek nejvyšší úrovně uvažované pro provedení analýzy. Základní linie záznamu musí být rovná, bez jakýchkoli piků nebo driftů.

Záporné driftы jsou známkou nedokonalé těsnosti spojů kolony, zatímco kladné svědčí o nedostatečné kondicionaci kolony.

Poznámka 6 Teplota kondicionace musí být nejméně o 20 °C nižší než maximální teplota použitelná pro uvažovanou stacionární fázi.

5.4.2 Výběr pracovních podmínek

- 5.4.2.1 Všeobecné pracovní podmínky jsou tyto:

- teplota kolony: 260 ± 5 °C,
- teplota odpařovací jednotky: 280 °C,
- teplota detektoru: 290 °C,
- lineární rychlost nosného plynu: helium 20 až 35 cm/s, vodík 30 až 50 cm/s,
- oddělovací poměr: 1:50 až 1:100,
- citlivost přístroje: 4 až 16násobek minimálního útlumu,
- citlivost záznamu: 1 až 2 mV f.s.,
- rychlost posunu papíru, nastavitelná na hodnoty mezi 30 až 60 cm/hod,

▼B

— množství nastříknuté látky: 0,5 až 1 µl trimethylsilyletherového roztoku.

Výše uvedené podmínky mohou být upraveny podle charakteristik kolony a plynového chromatografu s cílem zajistit, aby chromatogramy splňovaly tyto podmínky:

— retenční čas betasitosterolu musí být 20 ± 5 minut,

— pík kampesterolu musí být u olivového oleje (střední obsah 3 %) 0 ± 20 % plného rozsahu a u sojového oleje (střední obsah 20 %) 40 ± 20 % plného rozsahu;

— všechny přítomné steroly musí být odděleny. Kromě separace musí být píky též zcela rozlišeny, tj. dráha záznamu píku se musí vrátit na základní linii dříve, než se zvedne do dalšího píku. Neúplné rozlišení je však tolerováno za předpokladu, že pík s relativním retenčním časem 1,02 je možné kvantifikovat pomocí kolmé úsečky.

5.4.3 Provedení analýzy

5.4.3.1 Do mikrostříkačky na 10 µl se natáhne 1 µl hexanu, poté 0,5 µl vzduchu a nakonec 0,5 až 1 µl zkušebního roztoku. Pist mikrostříkačky se povytáhne tak, aby se vyprázdnila jehla. Jehla se zavede přes septum vstříkové komory a přibližně po jedné nebo dvou sekundách se rychle vstříkne roztok. Přibližně po pěti sekundách se jehla pomalu vytáhne.

5.4.3.2 Zaznamenávání je prováděno, dokud přítomná trimethylsilyletherová směs sterolů není zcela eluována.

Základní linie záznamu musí vždy odpovídat požadavkům odstavce 5.4.1.2.

5.4.4 Identifikace píků

Identifikace jednotlivých píků se provádí podle retenčních časů a porovnáním se standardní směsí trimethylsilyletherů analyzovanou za stejných podmínek.

Steroly jsou eluovány v tomto pořadí: cholesterol, brassikasterol, 24-methyl-en-cholesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, delta-7-kampesterol, delta-5, 23-stigmastadienol, chlerosterol, betasitosterol, sitostanol, delta-5-avenasterol, delta-5, 24-stigmastadienol, delta-7-stigmastenol a delta-7-avenasterol.

Retenční časy sitosterolu v případě kolon SE-52 a SE-54 jsou uvedeny v tabulce 1.

Chromatogram typický pro některé oleje je vidět na obrázku 1 a 2.

5.4.5 Kvantitativní vyhodnocení

5.4.5.1 Pomocí integrátoru se vypočítá plocha píků α -cholestanolu a sterolů. Píky jakýchkoli sloučenin, které nejsou mezi sloučeninami uvedenými v tabulce 1. Koefficient odezvy β -cholestanolu musí být roven 1.

5.4.5.2 Obsah jednotlivých sterolů vyjádřený v mg/100 g tuku se vypočítá podle vzorce:

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

▼ B

kde

A_x = plocha píku sterolu x ► **M6** ————— ◀,

A_s = plocha β -cholestanolu ► **M6** ————— ◀,

m_s = množství přidaného β -cholestanolu v mg,

m = množství vzorku použitého pro stanovení v g.

6. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

6.1 Uvádí se obsah jednotlivých sterolů v mg/100 g tuku a souhrn „obsah sterolů celkem“.

6.2 Procentní podíl jednotlivých sterolů z poměru plochy příslušného píku k celkové ploše piků sterolů se vypočítá podle vzorce:

$$\% \text{ sterolů } x = \frac{A_x}{\sum A} \cdot 100$$

kde

A_x = plocha píku sterolu x,

$\sum A$ = celková plocha piků sterolů.

▼B

DODATEK

Stanovení lineární rychlosti plynu

Do plynového chromatografu nastaveného na normální pracovní podmínky se vstříkne 1 až 3 μ l methanu nebo propanu a pomocí stopky se změní doba průchodu plynu kolonou od počátku vstříku do okamžiku eluce píků (t_M).

Lineární rychlost proudění v cm/s je dána poměrem L/t_M , kde L je délka kolony v cm a (t_M) je čas v sekundách, změřený stopkami.

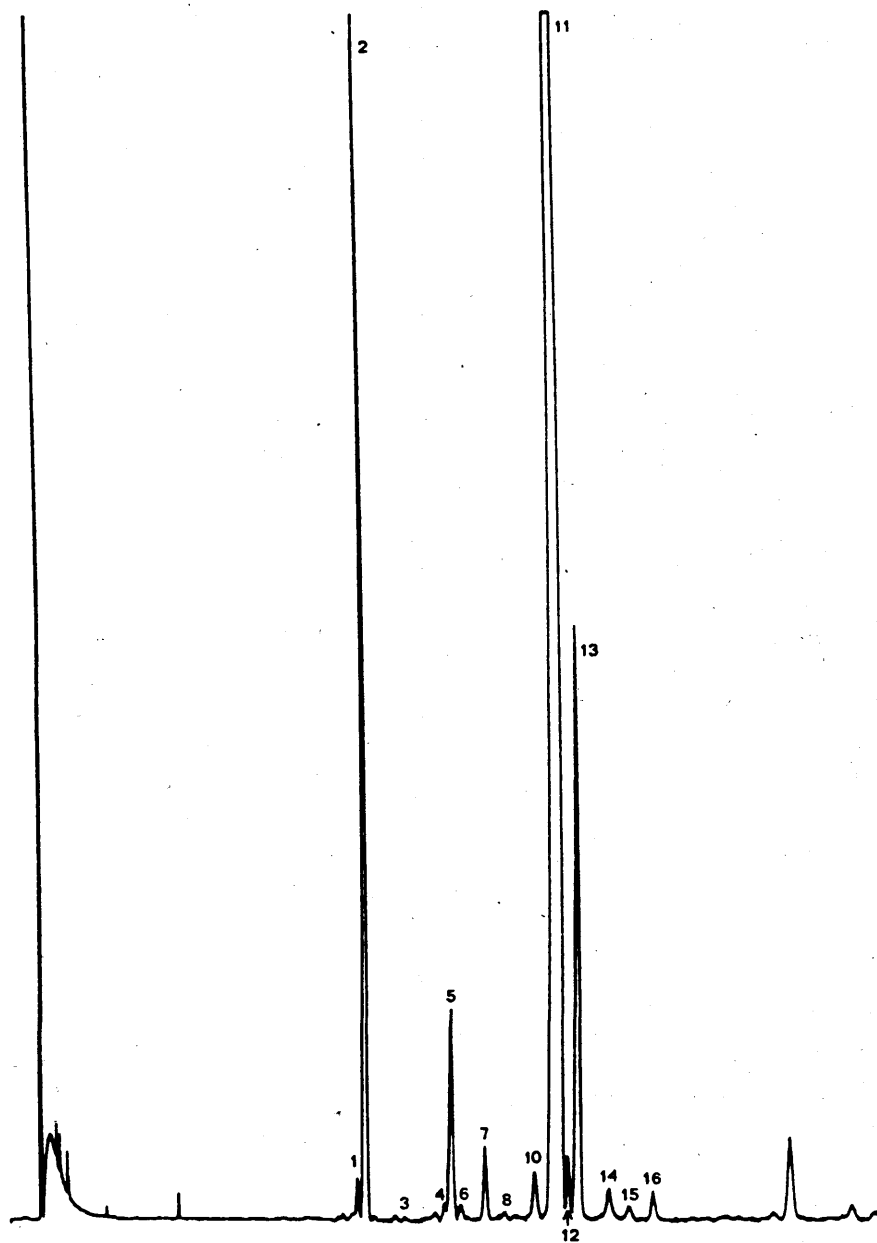
Tabulka 1

Relativní retenční časy sterolů

Pík	Identifikace		Relativní retenční čas	
			kolona SE 54	kolona SE 52
1	cholesterol	Δ -5-cholesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	cholestanol	5 α -cholestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	brassikasterol	[24S]- 24-methyl- Δ -5,22-cholestadien-3 β -ol	0,73	0,71
4	24-methyl-en-cholesterol	24-methyl-en- Δ -5,24-cholesten-3 β -ol	0,82	0,80
5	kampesterol	[24R]- 24-methyl- Δ -5-cholesten-3 β -ol	0,83	0,81
6	kampestanol	[24R]- 24-methyl-cholestan-3 β -ol	0,85	0,82
7	stigmasterol	[24R]- 24-methyl- Δ -5,22-cholestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-kampesterol	[24R]- 24-methyl- Δ -7-cholesten-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadienol	[24R, S]- 24-ethyl- Δ -5,23-cholestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	chlerosterol	[24S]- 24-ethyl- Δ -5,25-cholestadien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -sitosterol	[24R]- 24-ethyl- Δ -5-cholestan-3 β -ol	1,00	1,00
12	sitostanol	24-ethylcholestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterol	[24Z]- 24-ethyliden- Δ -5-cholesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5,24-stigmastadienol	[24R,S]- 24-ethyl- Δ -5,24-cholestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenol	[24R, S]- 24-ethyl- Δ -7,24-cholestadien-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterol	[24Z]- 24-ethyliden- Δ -7-cholesten-3 β -ol	1,16	1,16

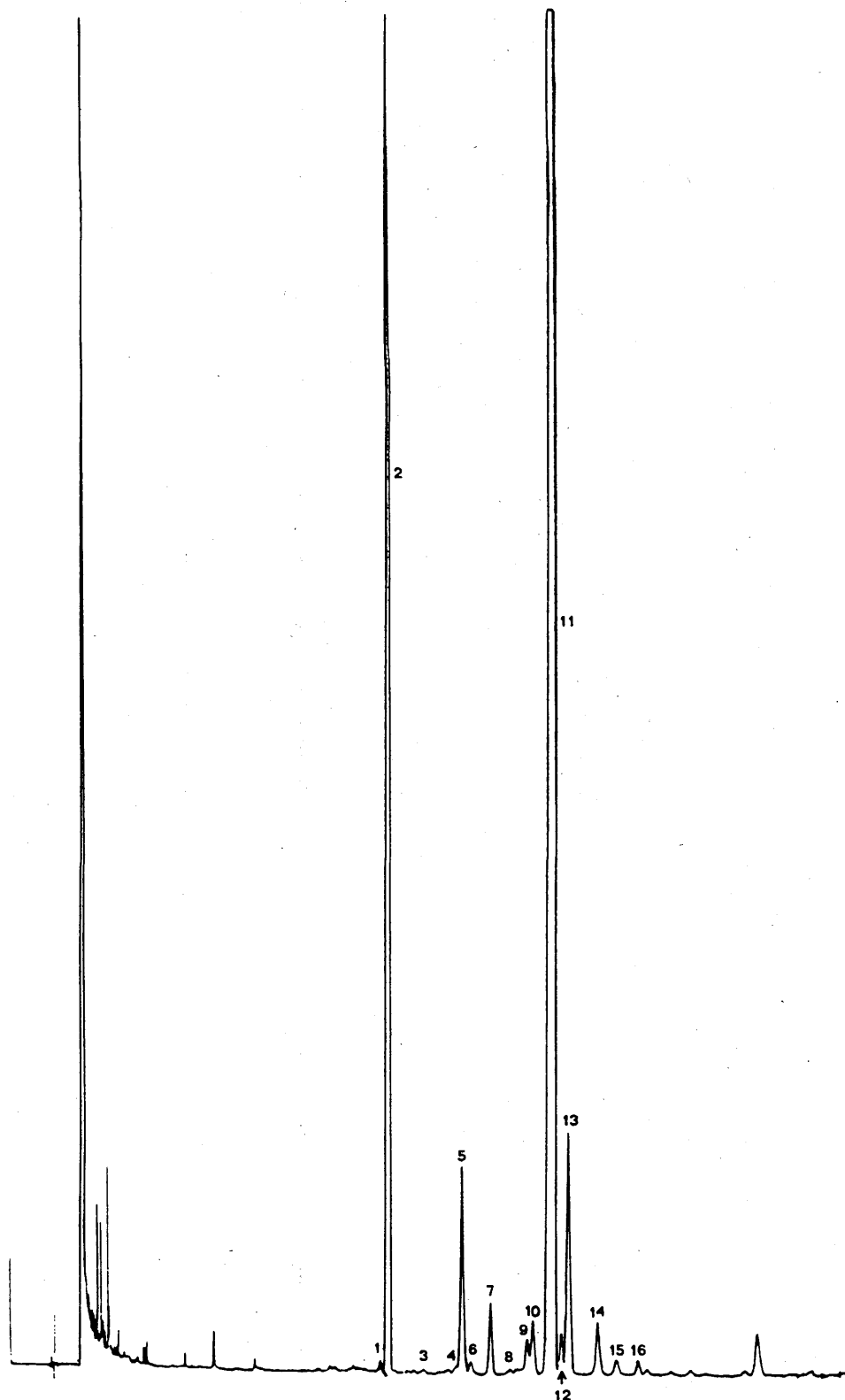
▼B

Obrázek 1

Plynový chromatogram sterolové frakce surového olivového oleje

▼B

Obrázek 2

Plynový chromatogram sterolové frakce rafinovaného olivového oleje



PŘÍLOHA VI

STANOVENÍ ERYTHRODIOLU A UVAOLU

ÚVOD

Erythrodiol (obvykle chápaní jako úhm glykolů erythrodiol a uvaolu) je složkou nezmýdelnitelného podílu, charakteristického pro některé typy tukových látek. V olivovém oleji extrahovaném pomocí rozpouštědel se nachází ve významně vyšších koncentracích než v ostatních olejích, jako například lisovaném olivovém oleji a v hroznovém oleji, které erythrodiol také obsahují, a tak jeho přítomnost může prokázat existenci olivového oleje extrahovaného pomocí rozpouštědel.

1. PŘEDMĚT

Tato metoda popisuje postup stanovení přítomnosti erythrodiolu v tukové látce.

2. PODSTATA METODY

Zmýdelnění tukové látky pomocí ethanického roztoku hydroxidu draselného. Extrakce nezmýdelnitelných látek pomocí diethyletheru. Vyčištění průchodem kolonou s oxidem hlinitým.

Nezmýdelnitelné látky se podrobují tenkovrstvé chromatografii na silikagelové desce, dokud nejsou oddělena pásma odpovídající sterolové a erythrodiolové frakce. Steroly a erythrodiol oddělené ze silikagelu se převedou na trimethylsilylether a analyzují pomocí kapilární plynové chromatografie.

Výsledek je vyjádřen jako procentní podíl erythrodiolu ve směsi erythrodiolu a sterolů.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Přístroje a pomůcky uvedené v příloze V (Stanovení obsahu a složení sterolů).

4. CHEMIKÁLIE

4.1 Chemikálie uvedené v příloze V (Stanovení obsahu a složení sterolů).

4.2 Referenční 0,5 % roztok erythrodiolu v chloroformu.

5. POSTUP

5.1 **Příprava nezmýdelnitelných látek**

Viz přílohu V odst. 5.1.2.

5.2 **Separace erythrodiolu a sterolů**

5.2.1 Viz přílohu V odst. 5.2.1.

5.2.2 Viz přílohu V odst. 5.2.2.

5.2.3 Připravte 5 % roztok nezmýdelnitelných látek v chloroformu.

300 µl tohoto roztoku se pomocí mikrostřikačky na 0,1 ml nastříkne jako co nejrovnoměrnější a co nejtenčí pruh na tenkovrstvou desku přibližně 1,5 cm od dolního okraje desky

Na jeden konec desky se nanese několik mikrolitrů roztoků cholesterolu a erythrodiolu, které budou sloužit jako referenční látka.

5.2.4 Deska se umístí do vyvíjecí komory uvedené v odstavci 5.2.1. Teplota se udržuje kolem 20 °C. Vyvíjecí komora se okamžitě uzavře a vzorek se nechá eluovat, dokud čelo rozpouštědla nedosáhne přibližně 1 cm od horního okraje desky. Deska se poté vyjme z vyvíjecí komory a rozpouštědlo se nechá odpařit pod proudem horkého vzduchu.

▼ B

5.2.5 Deska se lehce a rovnoměrně postříká alkoholovým roztokem 2,7-dichlorfluoresceinu a pozoruje se pod ultrafialovým zářením. Erythrodiolová pásma je možno stanovit porovnáním s referenčním roztokem. Obrysy pásma podél okrajů fluorescence se vyznačí černým značkovačem.

5.2.6 Silikagel se z označené oblasti seškrábe pomocí kovové špachtle. Odebraná hmota se převede do baňky na 50 ml. Přidá se 15 ml horkého chloroformu, dobře protřepe a přefiltruje přes nálevku s diskem ze sintrovaného skla tak, aby se silikagel převedl do filtru. Třikrát se propere horkým chloroformem (vždy 10 ml) a filtrát se shromáždí v baňce na 100 ml. Filtrát se odpaří na objem přibližně 4 až 5 ml a zbytkový roztok se převede do kalibrované kónické vakuové baňky na 10 ml, vysuší pod mírným proudem dusíku a zváží.

5.3 Příprava trimethylsilyletherů

Viz odst. 5.3 přílohy V.

5.4 Analýza plynovou chromatografií

Viz popis v odstavci 5.4 předchozí metody. Pracovní podmínky plynového chromatografu při analýze musí být takové, aby umožnily provedení analýzy sterolů a separace trimethylsilyletheru od erythrodiolu a uvaolu.

Po nastříknutí vzorku je prováděno zaznamenávání, dokud přítomná směs sterolů, erythrodiolu a uvaolu není zcela eluována. Pak určete píky (relativní retenční časy vzhledem k betasitosterolu jsou u erythrodiolu přibližně 1,45 a u uvaolu 1,55) a vypočtete obsahy ploch jako v případě sterolů.

6. VYJÁDRĚNÍ VÝSLEDKŮ

$$\% \text{ erythrodiolu} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{sterolů}}} \times 100$$

kde

A_1 = plocha píku erythrodiolu ► **M6** ————— ◀

A_2 = plocha píku uvaolu ► **M6** ————— ◀

$\sum A_{\text{sterolů}}$ = celková plocha pík sterolů ► **M6** ————— ◀.

Výsledek se vypočítá s přesností na jedno desetinné místo.

▼ **M21***PŘÍLOHA VII***STANOVENÍ PROCENTUÁLNÍHO PODÍLU 2-GLYCERIL MONOPALMITÁTU****1. PŘEDMĚT A ROZSAH POUŽITÍ**

Tato metoda popisuje analytický postup stanovení procentuálního podílu kyseliny palmitové ve 2. pozici triglyceridů hodnocením 2-glyceril monopalmitátu.

Tato metoda se použije na tekuté rostlinné oleje při teplotě okolí (20 °C).

2. PODSTATA METODY

Po přípravě se vzorek oleje podrobí účinku pankreatické lipázy. Parciální a specifická hydrolýza v pozici 1 a 3 molekuly triglyceridu způsobuje, že monoglyceridy se objeví na 2. pozici. Procentuální podíl 2-glyceril monopalmitátu v monoglycerické frakci se stanoví po silylaci pomocí kapilární plynové chromatografie.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Kónická 25ml baňka.

3.2 Kádinky na 100, 250 a 300 ml.

3.3 Skleněná chromatografická kolona o vnitřním průměru 21–23 mm a délce 400 mm s vložkou ze sintrovaného skla a kohoutem.

3.4 Nedělené pipety na 10, 50, 100 a 200 ml.

3.5 Baňky na 100 a 250 ml.

3.6 Rotační odpařovač.

3.7 Centrifugační zkumavky s konickým dnem na 10 ml se zabroušenou skleněnou zátkou.

3.8 Odstředivka pro zkumavky o obsahu 10 a 100 ml.

3.9 Termostat umožňující udržet teplotu na 40 °C s přesností na 0,5 °C.

3.10 Dělené pipety na 1 a 2 ml.

3.11 Hypodermická stříkačka na 1 ml.

3.12 Mikrostříkačka na 100 µl.

3.13 Nálevka na 1 000 ml.

3.14 Plynový chromatograf pro kapilární kolony se studeným nástřikovým zařízením *on column* pro přímé zavádění vzorku do kolony a s termostatem, který je schopen udržovat žádanou teplotu s přesností na 1 °C.

3.15 Studené nástřikové zařízení *on column* pro přímé zavádění vzorku do kolony.

3.16 Plameno-ionizační detektor a elektrometr.

3.17 Integrátor se zapisovačem, vhodný pro elektrometr, s rychlostí odezvy nižší než 1 sekundu a s nastavitelnou rychlostí posunu papíru.

3.18 Kapilární kolona, ze skla nebo taveného křemene, dlouhá 8 až 12 m s vnitřním průměrem 0,25 až 0,32 mm, obsahující methylpolysiloxan nebo 5 %-feny-methylpolysiloxan, o tloušťce 0,10 až 0,30 µm, kterou je možno použít při 370 °C.

▼ M21

- 3.19 Mikrostříkačka na 10 µl pro přímý vstřík do kolony opatřená tvrzenou jehlou o délce min. 7,5 cm.
4. CHEMIKÁLIE
- 4.1 Silikagel s velikostí zrna od 0,063 až po 0,200 mm (70/280 mesh), který se připraví takto: silikagel se položí do porcelánové misky, suší se v sušárně po dobu 4 hodin při teplotě 160 °C, pak se nechá ochladit v exsikátoru při pokojové teplotě. Přidá se voda o objemu shodném s 5 % váhy silikagelu takto: do 500 ml baňky se naváží 152 g silikagelu a přidá se 8 g destilované vody, baňka se zazátkuje a jemně protřepá, aby se voda rozložila rovnoměrně. Nechá se odstát na alespoň 12 hodin před použitím.
- 4.2 n-hexan pro chromatografii.
- 4.3 Isopropanol.
- 4.4 Isopropanol, vodný roztok 1/1 (V/V).
- 4.5 Pankreatická lipáza. Použitá lipáza musí mít aktivitu mezi 2,0 A 10 jednotkami lipázy na mg (v obchodě existují pankreatické lipázy s aktivitou mezi 2 a 10 jednotkami na mg enzymu).
- 4.6 Tlumivý roztok trihydroxy-methyl-aminomethanu: 1 M vodný roztok upravený na pH 8 (kontrola potenciometrem) přidáním koncentrované kyseliny chlorovodíkové (1/1 V/V).
- 4.7 Cholát sodný (enzymatické kvality), vodný roztok o koncentraci 0,1 % (tento roztok se musí použít do 15 dnů po přípravě).
- 4.8 Chlorid vápenatý, vodný roztok o koncentraci 22 %.
- 4.9 Diethylether pro chromatografii.
- 4.10 Vyvíjecí rozpouštědlo: směs n-hexanu/diethyletheru (87/13) (V/V).
- 4.11 Hydroxid sodný, roztok o koncentraci 12 % hmotnostních.
- 4.12 Fenolftalein, 1 % roztok ethanolu.
- 4.13 Nosný plyn: vodík nebo helium, pro plynovou chromatografii.
- 4.14 Pomocné plyny: – vodík o minimální čistotě 99 %, bez vlhkosti a organických látek, a vzduch, pro plynovou chromatografii stejná čistota.
- 4.15 Silanizační činidla: směs pyridinu/hexametyldisilazanu, trimethylchlorosilanu 9/3/1 (V/V/V) (Roztoky připravené k použití jsou na trhu. Mohou se použít jiná silylační činidla, zejména bis-trimethylsilyl trifluoracetamid + 1 % trimethylchlorosilan, zředěná stejným objemem bezvodého pyridinu.)
- 4.16 Referenční vzorky: čisté monoglyceridy nebo směsi, které mají podobné procentuální složení jako vzorek.
5. POSTUP
- 5.1 **Příprava vzorku**
- 5.1.1 Oleje, které mají volnou kyselost nižší než 3 %, nemusí být neutralizovány před chromatografií na silikagelové koloně. Oleje, které mají volnou kyselost vyšší než 3 %, musí být neutralizovány podle bodu 5.1.1.1.

▼ M21

- 5.1.1.1 Do nálevky na 1 000 ml (3.13) se vleje 50 g oleje a 200 ml n-hexanu. Přidá se 100 ml isopropanolu a množství roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 12 % (4.11) odpovídající volné kyselosti oleje, plus 5 % navíc. Jednu minutu se důkladně protřepe. Přidá se 50 ml destilované vody, znovu se protřepe a nechá se usadit.

Po dělení se odstraní spodní mýdlová vrstva. Odstraní se také jakékoli mezilehlé vrstvy (sliz, nerozpustné hmoty). Hexanový roztok neutralizovaného oleje se promyje následnými dávkami 50 až 60 ml roztoku isopropanolu/vody 1/1 (V/V) (4.4), dokud růžové zbarvení fenolftaleinu nezmizí.

Většina hexanu se odstraní destilací ve vakuu (např. v rotačním odpařovači) a olej se přelije do baňky na 100 ml (3.5). Olej se suší ve vakuu, dokud nebude rozpouštědlo zcela odstraněno.

K tomu musí být kyselost oleje nižší než 0,5 %.

- 5.1.2 Do kónické 25 ml baňky (3.1) se převede olej připravený podle výše uvedeného způsobu a rozpustí se ve vyvíjecím rozpouštědle (10 ml, 4.10). Roztok se nechá odstát na alespoň 15 minut před chromatografií na silikagelové koloně.

Pokud je roztok kalný, odstředí se, aby byly zabezpečeny optimální podmínky pro chromatografií. (*Mohou se použít kartony silikagelu SPE na 500 mg, které jsou připraveny k použití.*)

- 5.1.3 *Příprava chromatografické kolony*

Do kolony se vlije (3.3) zhruba 30 ml vyvíjecího rozpouštědla (4.10) a pomocí skleněné tyčinky se do spodní části kolony zavede kousek vaty. Stlačí se, aby se odstranil vzduch.

V kádince se připraví suspenze 25 g silikagelu (4.1) ve zhruba 80 ml vyvíjecího rozpouštědla a naleje se do kolony za pomoci nálevky.

Ověří se, zda je celý silikagel zaveden do kolony; vymyje se vyvíjecím rozpouštědlem (4.10), otevře se kohoutek a hladina kapaliny se nechá dostoupit zhruba 2 mm nad horní úroveň silikagelu.

- 5.1.4 *Kolonová chromatografie*

Do 25 ml baňky (3.1) se naváží přesně 1,0 g připraveného vzorku podle bodu 5.1.

Vzorek se rozpustí v 10 ml vyvíjecího rozpouštědla (4.10). Roztok se vlije do připravené chromatografické kolony podle bodu 5.1.3. Zabrání se tomu, aby se plocha kolony hýbala.

Otevře se kohoutek a roztok vzorku se nechá odkapat, než dosáhne hladiny silikagelu. Rozpustí se pomocí 150 ml vyvíjecího rozpouštědla. Průtok se upraví na 2 ml/min (tak, aby 150 ml protéklo do kolony přibližně za 60–70 minut).

Do baňky na 250 ml, která byla předtím zvážena, se odebere eluát. Rozpouštědlo se ve vakuu odpaří a jeho zbylé stopy se odstraní pod proudem dusíku.

Baňka se zváží a vypočítá se množství získaného extraktu.

▼ **M21**

(V případě použití už hotových silikagelových patron SPE se postupuje takto: zavede se 1 ml roztoku (5.1.2) do předem připravených patron s 3 ml n-hexanu.

Po perkolování roztoku se vyvíjí 4 ml n-hexanu/dietyleru v objemovém poměru 9/1 (V/V).

Eluát se odebere do 10 ml zkumavky a odpařuje se pod proudem dusíku až do vysušení.

Suché reziduum se podrobí pankreatické lipáze (5.2). Základem je ověřit složení mastných kyselin před a po přechodu patronou SPE.)

5.2 Hydrolyza pankreatickou lipázou

5.2.1 Do centrifugační zkumavky se odváže 0,1 g oleje připraveného podle bodu 5.1. Přidá se 2 ml tlumivého roztoku (4.6), 0,5 ml roztoku cholátu sodného (4.7) a 0,2 ml roztoku chloridu vápenatého, přičemž po každém přidání se protřepe řádně směsí. Zkumavka se uzavře zábrusovou zátkou a umístí se do termostatu při teplotě $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2 Přidá se 20 mg lipázy, opatrně se protřepe (tak, aby se nenamočila zátkka), a zkumavka se dá do termostatu přesně na 2 minuty, potom se vybere, během 1 minuty důkladně protřepává a nechá se vychladit.

5.2.3 Přidá se 1 ml dietyleru, zazátkuje se a důkladně protřepe, potom se odstředí a pomocí mikrostříkačky se roztok etheru přenesse do čisté a suché zkumavky.

5.3 Příprava silanizovaných derivátů a plynová chromatografie

5.3.1 Pomocí mikrostříkačky se 100 µl roztoku (5.2.3) zavede do 10 ml zkumavky s kónickým dnem.

5.3.2 Rozpouštědlo se odstraní pod slabým proudem dusíku, přidá se 200 µl silanizačního činidla (4.15), zkumavka se uzavře zátkou a nechá 20 minut odstát.

5.3.3 Po 20 minutách se přidá 1 až 5 ml n-hexanu (v závislosti na chromatografických podmínkách): výsledný roztok je připravený pro plynovou chromatografii.

5.4 Plynová chromatografie

Pracovní podmínky jsou tyto:

— teplota nástřikového zařízení (nástřikové zařízení *on column*) nižší než teplota varu rozpouštědla (68 °C),

— teplota detektoru: 350 °C,

— teplota kolony: nastavení teploty pece: 60 °C během 1 minuty, každou minutu se zvýší o 15 °C až do dosažení 180 °C, potom o 5 °C za minutu až do 340 °C, dále se udržuje 340 °C během 13 minut,

— nosný plyn: vodík nebo helium nastavené na lineární rychlost přiměřenou k dosažení rozlišení znázorněného na obrázku 1. Retenční čas triglyceridu C₅₄ musí být 40 ± 5 minut (viz obrázek 2) (Výše uvedené podmínky postupu se uvádějí pouze orientačně. Každý subjekt je musí pro dosažení požadovaného rozlišení optimalizovat. Výška piku odpovídající 2-glyceril monopalmitátu musí dosáhnout alespoň 10 % rozsahu stupnice zapisovače.),

▼ M21

— množství nastříknuté látky: 0,5–1 µl roztoku (5 ml) n-hexanu (5.3.3).

5.4.1 Identifikace píků

Identifikace jednotlivých monoglyceridů se provádí podle retenčních časů a porovnáním se standardními směsmi monoglyceridů, které byly analyzovány za stejných podmínek.

5.4.2 Kvantitativní vyhodnocení

Plocha každého píku se vypočítá pomocí elektronického integrátoru.

6. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

Procentuální obsah glyceryl monopalmitátu se vypočítá na základě vztahu mezi plochou odpovídajícího píku a součtem ploch píků všech monoglyceridů (viz obrázek 2), podle vzorce:

$$\text{Glycéril monopalmitate (\%)}: \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

(Glycéril monopalmitate = glyceril monopalmitát)

kde:

A_x = plocha píku, který odpovídá glyceril monopalmitátu;

$\sum A$ = součet ploch všech píků, které odpovídají monoglyceridům;

Výsledek se uvádí s přesností na jedno desetinné místo.

7. ZPRÁVA O ANALÝZE

Zpráva o analýze musí uvádět:

— odkaz na tuto metodu,

— všechny údaje potřebné k úplné identifikaci vzorku,

— výsledek analýzy,

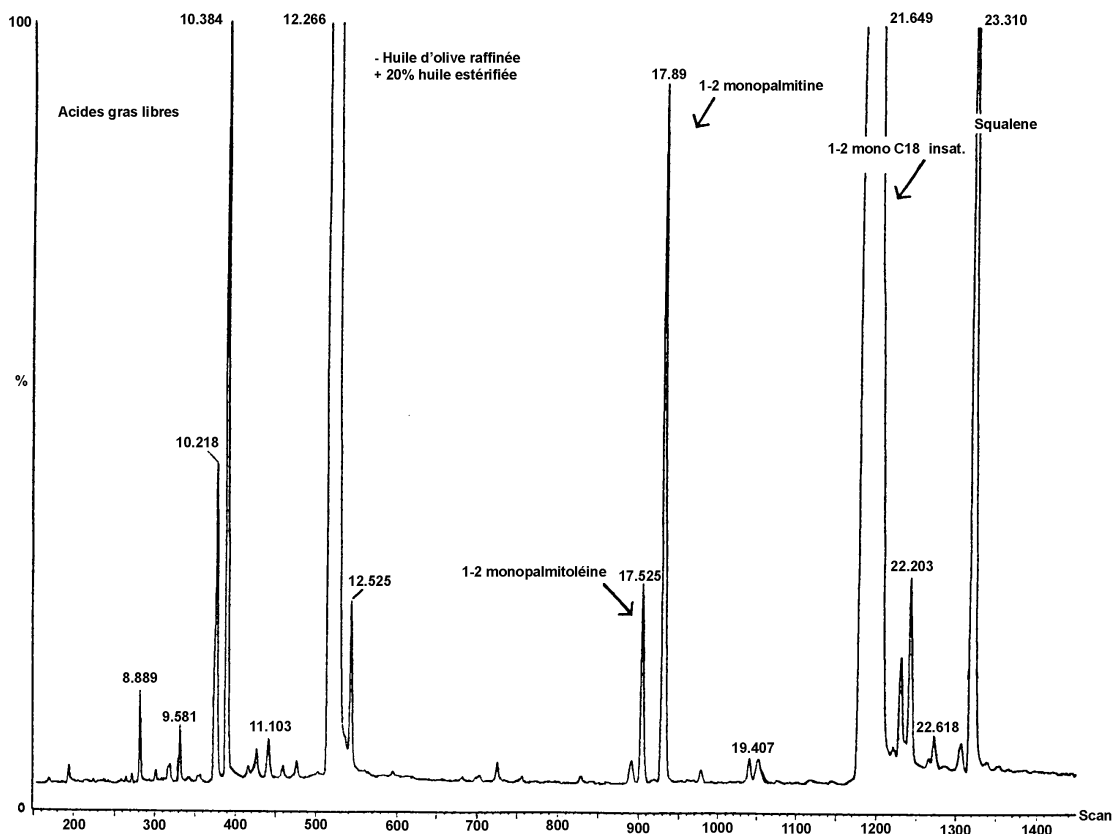
— každý odklon od této metody, ať už pokud jde o rozhodnutí dotčených stran nebo z jiného důvodu,

— podrobné identifikační údaje o laboratoři, datum uskutečnění analýzy a podpis osob odpovědných za analýzu.

▼ M21

Obrázek 1

Chromatogram produktů z reakce silanizace, které byly získány lipázou na rafinovaném olivovém oleji s přidáním 20 % esterifikovaného oleje (100 %)



Vysvětlivky: „acides gras libres“ = volné mastné kyseliny; „Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée“ = rafinovaný olivový olej + 20 % esterifikovaný olej; „1-2 monopalmitoléine“ = 1-2 monopalmitolein; „1-2 mono C₁₈ insat.“ = nenasycený 1-2 mono C₁₈; „squalene“ = squalen.

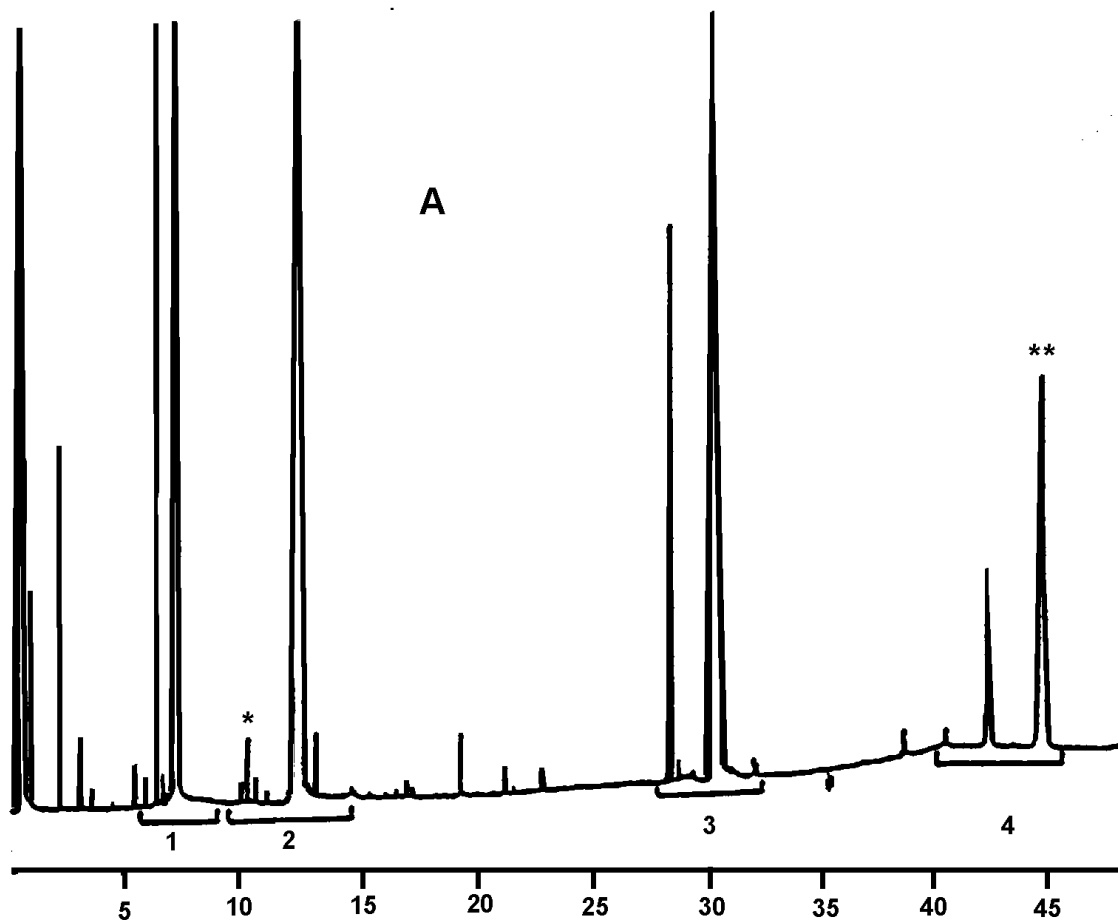
▼ M21

Obrázek 2

Chromatogram:

A) neesterifikovaného olivového oleje po lipáze; po silanizaci; za těchto podmínek (kapilární kolona 8–12 m) je vosková frakce eluovaná zároveň s frakcí diglyceridu nebo krátce poté.

Po lipáze by obsah triglyceridů neměl překročit 15 %



Vysvětlivky:

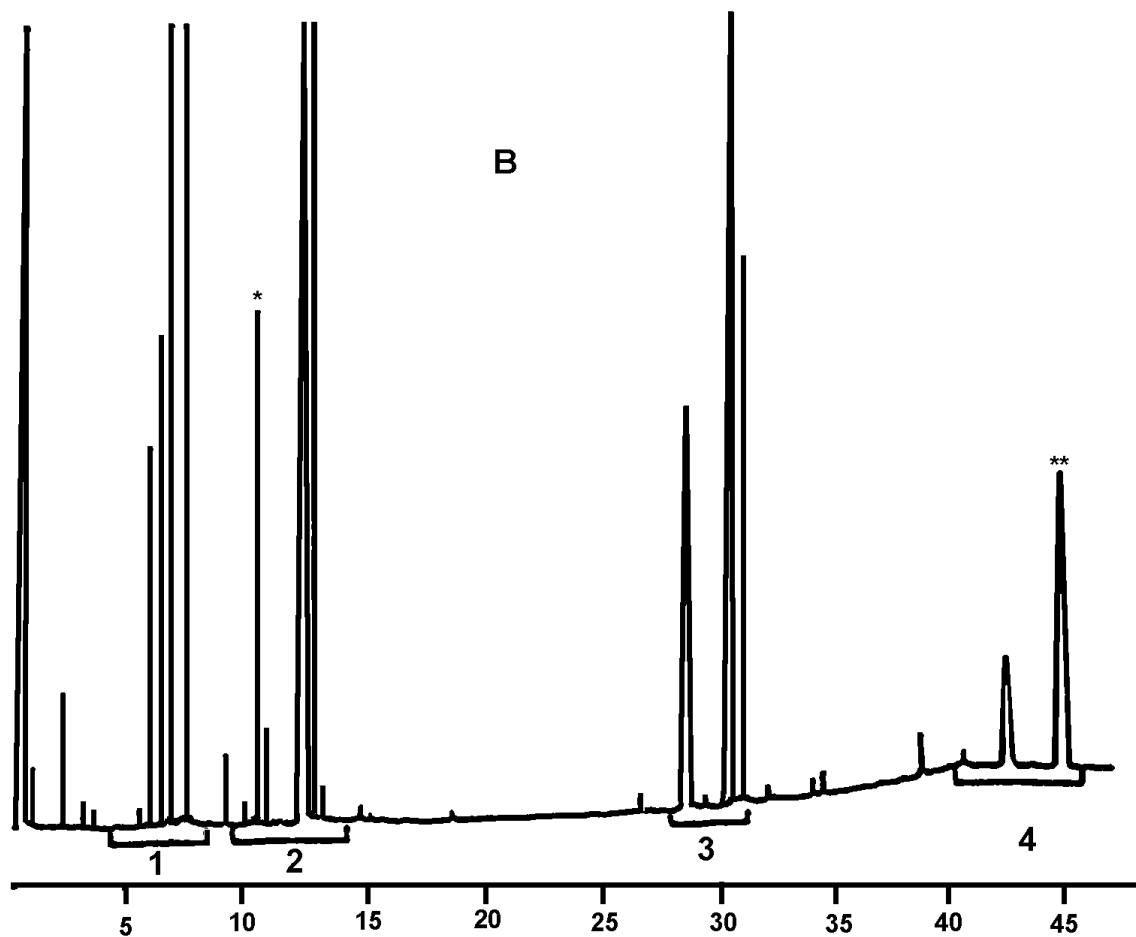
- 1 = Volné mastné kyseliny
- 2 = Monoglyceridy
- 3 = Diglyceridy
- 4 = Triglyceridy
- * = 2-monopalmitin
- ** = Triglycerid C₅₄

▼ M21

Chromatogram:

B) esterifikovaného olivového oleje po lipáze; po silanizaci; za těchto podmínek (kapilární kolona 8–12 m) je vosková frakce eluovaná zároveň s frakcí diglyceridu nebo krátce poté.

Po lipáze by obsah triglyceridů neměl překročit 15 %



Vysvětlivky:

- 1 = Volné mastné kyseliny
- 2 = Monoglyceridy
- 3 = Diglyceridy
- 4 = Triglyceridy
- * = 2-monopalmitin
- ** = Triglycerid C₅₄

▼ **M21**

8. POZNÁMKY

Poznámka 1: PŘÍPRAVA LIPÁZY

Lipázy s dostatečnou aktivitou jsou obchodně dostupné. Je ale rovněž možné je připravit v laboratoři takto:

5 kg čerstvé vepřové slinivky břišní se vychladí na 0 °C; okolní sádlo a vazivová tkáň se oddělí a v míchadle se rozmělní, dokud nevznikne tekutá mazlavá pasta. Tato pasta se protřepe po dobu 4 až 6 hodin s 2,5 l bezvodého acetonu a poté odstředí. Zbytek se extrahuje třikrát pomocí stejného množství bezvodého acetonu, potom dvakrát pomocí směsi acetonu a diethyletheru 1:1 (V/V) a dvakrát pomocí diethyletheru.

Zbytek se po 48 hodin suší ve vakuu za účelem získání stabilního prášku, který je možné dlouho skladovat v ledničce chráněný před vlhkostí.

Poznámka 2: KONTROLA AKTIVITY LIPÁZY

Emulze olivového oleje se připraví takto:

V míchadle se po 10 minut protřepává směs složená ze 165 ml roztoku arabské gumy o koncentraci 100 g/l, 15 g drceného ledu a 20 ml předem neutralizovaného oleje.

Do 50 ml kádinky se zavede 10 ml této emulze, poté se postupně přidá 0,3 ml roztoku cholátu sodného o koncentraci 0,2 g/ml a 20 ml destilované vody.

Kádinka se vloží do termostatu udržovaného na teplotě 37 °C; vloží se elektrody pH metru a spirálovité míchadlo.

Pomocí byrety se po kapkách přidává roztok hydroxidu sodného 0,1 N, dokud hodnota pH nedosáhne 8,3.

Přidá se objem vodní suspenze lipázy (0,1 g/ml lipázy). Jakmile pH metr začne ukazovat pH 8,3, zapnou se stopky a po kapkách se přikapává roztok hydroxidu sodného takovou rychlostí, aby se udržovala hodnota pH 8,3. Zaznamená se objem spotřebovaného roztoku za minutu.

Údaje se zaznamenávají do grafového systému souřadnic tak, že osa nezávisle proměnných (x-ová osa) ponese časové údaje a na ose závisle proměnných se uvede počet mililitrů alkalického roztoku 0,1 N spotřebovaného na udržení konstantního pH. Výsledný graf musí být lineární.

Aktivita lipázy vyjádřená v lipázových jednotkách na 1 mg je pak dána tímto vzorcem:

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

kde:

A je aktivita vyjádřená v jednotkách lipázy/mg;

V je počet ml roztoku hydroxidu sodného 0,1 N za minutu (vypočítaný z grafu);

N je molarita roztoku hydroxidu sodného;

m je hmotnost zkušební lipázy v mg.

Jednotka lipázy je definovaná jako množství enzymu, které uvolní 10 mikro-ekvivalentů kyseliny za minutu.

▼ **M20**

▼ B

PŘÍLOHA IX

SPEKTROFOTOMETRICKÁ ANALÝZA V ULTRAFIALOVÉ OBLASTI
SPEKTRA

PŘEDMLUVA

Spektrofotometrická analýza v ultrafialové oblasti spektra může poskytnout informace o jakosti tuku, stavu jeho zachovalosti a změnách způsobených technologickými procesy.

Absorpce na vlnových délkách specifikovaných v metodě je způsobena přítomností konjugovaných dienových a trienových systémů. Tyto absorpce jsou vyjádřeny jako specifické extinkce $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (extinkce vyvolaná 1 % roztokem tuku v předepsaném rozpouštědle při tloušťce vrstvy 1 cm) obvykle označované písmenem K (též zmiňované jako „extinkční koeficienty“).

1. PŘEDMĚT

Tato metoda popisuje postup při spektrofotometrické analýze olivového oleje v ultrafialové oblasti spektra.

2. PODSTATA METODY

Zkoumaný tuk se rozpustí v požadovaném rozpouštědle a poté se určí extinkce roztoku při určitých vlnových délkách proti čistému rozpouštědlu. Z výsledků spektrofotometrických měření se vypočtou specifické extinkce.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1 Spektrofotometr pro měření extinkce v ultrafialové oblasti spektra mezi 220 a 360 nm s možností odečítání jednotlivých nanometrických jednotek.

3.2 Pravoúhlé křemenné kyvety s víčky a optickou délkou 1 cm. Jsou-li naplněny vodou nebo jiným vhodným rozpouštědlem, nesmí vykazovat rozdíly větší než 0,01 jednotky extinkce.

3.3 Odměrné baňky na 25 ml.

▼ M6

3.4 Chromatografická kolona s horní částí o délce 270 mm a průměru 35 mm a dolní částí o délce 270 mm a průměru 10 mm.

▼ B

4. CHEMIKÁLIE

4.1 Spektrofotometricky čistý isooktan (2,2,4-trimethyl-pentan). Proti destilované vodě musí mít transmitanci nejméně 60 % při 220 nm a nejméně 95 % při 250 nm, nebo

— spektrofotometricky čistý cyklohexan: proti destilované vodě musí mít transmitanci nejméně 40 % při 220 nm a nejméně 95 % při 250 nm.

▼ M6

▼ B

4.2 Bazický oxid hlinitý pro kolonovou chromatografii připravený a zkontrolovaný v souladu s postupem uvedeným v příloze I.

4.3 *n* — hexan pro chromatografii.

▼ B

5. POSTUP

- 5.1 Zkoumaný vzorek musí být dokonale homogenní a bez podezřelých nečistot. Oleje, které jsou při normální teplotě kapalné, mají být přefiltrovány přes papír při teplotě přibližně 30 °C, pevné tuky je třeba homogenizovat a přefiltrovat při teplotě nejvýše 10 °C nad jejich bodem tání.
- 5.2 Naváží se přibližně 0,25 g takto připraveného vzorku do odměrné baňky na 25 ml, doplní se až ke značce předepsaným rozpouštědlem a homogenizuje. Výsledný roztok musí být dokonale čirý. Je-li roztok zakalený nebo obsahuje nečistoty, je nutno jej rychle přefiltrovat přes papír.
- 5.3 Kyveta se naplní získaným roztokem a změří se extinkce v oblasti vlnových délek 232 až 276 nm, jako referenční roztok slouží použité rozpouštědlo.

Zaznamenané hodnoty extinkce musí ležet v rozsahu 0,1 až 0,8. Pokud tomu tak není, musí být měření zopakována s použitím roztoků o vhodné upravené koncentraci.

- 5.4 Je-li nutné stanovit specifické extinkce po průchodu oxidem hlinitým, postupuje se takto: Do chromatografické kolony se nalije suspenze 30 g bazického oxidu hlinitého v hexanu. Po usazení adsorbentu se odstraní přebytečný hexan tak, aby převyšoval horní okraj oxidu hlinitého přibližně o 1 cm.

Rozpustí se 10 g tuku, homogenizovaného a filtrovaného podle popisu v odstavci 5.1, ve 100 ml hexanu a roztok se nalije do kolony. Shromáždí se eluát a odpaří se veškeré rozpouštědlo ve vakuu při teplotě nižší než 25 °C.

Takto získaný vzorek tuku se neprodleně zpracuje podle popisu v odstavci 5.2.

6. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

- 6.1 Zaznamenávají se specifické extinkce (extinkční koeficienty) při různých vlnových délkách vypočtené takto

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

kde

K_{λ} = specifická extinkce při vlnové délce λ ,

E_{λ} = extinkce při vlnové délce λ ,

c = koncentrace analytického roztoku v g/100 ml zkušebního roztoku,

▼ B

s = tloušťka kyvety v cm.

Výsledek se vypočítá s přesností na jedno desetinné místo.

- 6.2 Spektrofotometrická analýza olivového oleje v souladu s úřední metodou definovanou v nařízeních EHS předepisuje stanovení charakteristických extinkcí v roztoku isooktanu při vlnových délkách 232 a 270 nm a stanovení hodnoty ΔK , která je definována takto

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

kde K_m je charakteristická extinkce při vlnové délce m , vlnová délka v blízkosti 270 nm, při níž dochází k maximální absorpci.

▼B*DODATEK I**Příprava oxidu hlinitého a zkouška jeho aktivity***A.1.1** Příprava oxidu hlinitého

Oxid hlinitý, který byl nejprve tři hodiny sušen v laboratorní pídce při teplotě 380 až 400 °C, se vloží do hermeticky uzavřené nádoby, přidá se destilovaná voda v poměru 5 ml na 100 g oxidu hlinitého, nádoba se ihned uzavře, opakovaně protřepe a poté před použitím nechá nejméně 12 hodin v klidu.

A.1.2 Kontrola aktivity oxiduhlinitého

Připraví se chromatografická kolona s 30 g oxidu hlinitého. Postupem podle odstavce 5.4. se kolonou nechá projít směs tvořená:

- 95 % panenského olivového oleje se specifickou extinkcí menší než 0,18 při 268 nm,
- 5 % podzemnicového oleje, upravovaného za pomoci zeminy v procesu rafinace, s hodnotou specifické extinkce nejméně 4 při vlnové délce 268 nm.

Jestliže po průchodu kolonou má směs charakteristickou extinkci při 268 nm větší než 0,11, je oxid hlinitý přijatelný, pokud ne, úroveň dehydratace musí být zvýšena.

▼ B*DODATEK II**Kalibrace spektrofotometru*

- A.2 Zařízení musí být v pravidelných intervalech (nejméně jednou za šest měsíců) kontrolováno, pokud jde o vlnovou délku a přesnost odezvy.
- A.2.1 Vlnovou délku je možné kontrolovat pomocí rtuťové výbojky nebo pomocí vhodných filtrů.
- A.2.2 Při kontrole odezvy fotočlánku a fotonásobiče se postupuje takto: naváží se 0,2000 g čistého chromanu draselného pro spektrofotometrii a rozpustí se v roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 0,05 mol/l v 1 000 ml odměrné baňce a doplní po značku. Odebere se přesně 25 ml získaného roztoku, převede do odměrné baňky na 500 ml a doplní po značku stejným roztokem hydroxidu draselného.
- Extinkce takto získaného roztoku se změří při vlnové délce 275 nm proti roztoku hydroxidu draselného. Extinkce naměřená pomocí jednocentimetrové kyvety musí být $0,200 \pm 0,005$.

▼ B*PŘÍLOHA X A***ANALÝZA METHYLESTERŮ MASTNÝCH KYSELIN PLYNOVOU CHROMATOGRAFIÍ****1. PODSTATA**

Tato metoda popisuje použití plynové chromatografie s náplňovými nebo kapilárními kolonami pro stanovení kvalitativního a kvantitativního složení směsi methylesterů mastných kyselin, získaných podle metody uvedené v příloze X B.

Metoda není použitelná pro polymerní mastné kyseliny.

2. CHEMIKÁLIE**2.1 Nosný plyn**

Inertní plyn (dusík, helium, argon, vodík atd.), dokonale vysušený a s obsahem kyslíku menším než 10 mg/kg.

Poznámka 1 Vodík, který je používán pouze na kapilárních kolonách, umožňuje dvakrát zvýšit rychlost analýzy, ale je nebezpečný. Bezpečnostní zařízení jsou dostupná.

2.2 Pomocné plyny

2.2.1 Vodík (čistoty vyšší než 99,9 %), neobsahující organické nečistoty.

2.2.2 Vzduch nebo kyslík, neobsahující organické nečistoty.

2.3 Referenční standard

Směs methylesterů čistých mastných kyselin, nebo methylestery z oleje známého složení; výhodné je složení podobné analyzovanému vzorku.

Pozornost je nutno věnovat ochraně polynenasycených mastných kyselin před oxidací.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Uvedené pokyny se vztahují na obvyklá zařízení používaná pro plynovou chromatografii, používající náplňové, nebo kapilární kolony a plameno-ionizační detektor. Vhodné jsou přístroje dosahující účinnosti a rozlišení uvedené v odstavci 4.1.2.

3.1 Plynový chromatograf

Plynový chromatograf, obsahující následující části:

3.1.1 Injektor

Používá se injektor buď

a) pro náplňovou kolonu, který by měl mít pokud možno nejmenší mrtvý prostor (v tomto případě by měl být injektor schopen ohřátí na teplotu o 20 až 50 °C vyšší než je teplota kolony), nebo

b) pro kapilární kolonu, kde by injektor měl být konstruován přímo pro použití s touto kolonou. V tomto případě může být prováděn buď nástřik pomocí děliče (split type), nebo bez dělení přímo na kolonu (splitless type) nástřik „on column“.

▼B

Poznámka 2 Pokud nejsou přítomny mastné kyseliny s méně než 16 atomy uhlíku, může být použit injektor s pohyblivou jehlou.

3.1.2 Termostat

Termostat má mít schopnost vyhřát kolonu na teplotu nejméně 260 °C a udržovat žádanou teplotu s přesností na 1 °C v případě náplňové kolony a na 0,1 °C v případě kapilární kolony. Poslední požadavek je důležitý při použití křemenných kolon.

Použití ohřevu s programovanou teplotou je doporučeno ve všech případech, zejména pro mastné kyseliny s méně než 16 atomy uhlíku.

3.1.3 Náplňové kolony

3.1.3.1 Kolona má být vyrobena z materiálu, který je inertní k analyzovaným látkám (např. sklo nebo korozivzdorná ocel), a má mít následující rozměry:

a) délka: 1 m až 3 m. Relativně kratší kolony by mohly být použity za přítomnosti mastných kyselin s dlouhým řetězcem (nad C₂₀). Při analýzách kyselin se 4 nebo 6 uhlíkovými atomy se doporučuje použít kolonu o délce 2 m;

b) vnitřní průměr: 2 až 4 mm.

Poznámka 3 Jestliže jsou analyzovány polyenové kyseliny s více než třemi dvojnými vazbami, může na koloně z korozivzdorné oceli docházet k jejich rozložení.

Poznámka 4 Může být použit systém s dvěma náplňovými kolonami.

3.1.3.2 Náplň zahrnuje tyto části:

a) *nosič*: kyselinou praná a silanizovaná křemelina, nebo jiný vhodný inertní nosič s úzkým rozsahem velikosti částic (25 μm v rozmezí mezi 125 μm až 200 μm), přičemž průměrná velikost částic má vztah k vnitřnímu průměru a délce kolony;

b) *stacionární fáze*: polární fáze polyesterového typu (např. diethylenglykoljantarát polyester, butandioljantarát polyester, ethylenglykoladipát polyester atd.), kyanosilikony nebo jiné kapaliny splňující požadavky na chromatografickou separaci (viz bod 4). Stacionární fáze by měla tvořit 5 % až 20 % (m/m) z náplně. Pro určitá dělení může být použita nepolární stacionární fáze.

3.1.3.3 Kondicionace kolony

Připravená kolona odpojená od detektoru, je-li to možné, se postupně ohřeje v termostatu na teplotu 185 °C za průtoku inertního plynu rychlostí 20 ml/min až 60 ml/min, nechá se nejméně 16 hodin při této teplotě a další dvě hodiny při 195 °C.

3.1.4 Kapilární kolona

3.1.4.1 Trubice má být vyrobena z materiálu, který je inertní k analyzovaným látkám (např. sklo nebo tavený křemen). Vnitřní průměr by se měl pohybovat mezi 0,2 mm až 0,8 mm. Vnitřní povrch by měl být přiměřeným způsobem upraven (např. příprava povrchu, inaktivace). Délka 25 m je ve většině případů dostatečná.

▼B

- 3.1.4.2 Stacionární fáze, obvykle polyethylenglykolového typu (polyethylenglykol 20 000), polyestery (butandioljantarát polyester) nebo polární polysiloxany (kyanosilikony). Vhodné jsou vázané stacionární fáze (zesilované).

Poznámka 5 Při použití polárních polysiloxanů je nebezpečí obtížné identifikace a separace kyseliny linolenové a kyselin C₂₀.

Pokrytí by mělo být tenké, např. 0,1 μm až 0,2 μm.

- 3.1.4.3 Montáž a kondicionace kolony

Je nutno zachovat běžnou opatrnost při montáži kapilární kolony, např. úprava kolony v termostatu (nosič), výběr a provedení spojů (netěsné spoje), poloha konce kolony v injektoru a detektoru (zmenšení mrtvých prostorů). Kolona se nechá protékat nosný plyn (např. 0 kPa pro kolonu délky 25 mm a vnitřním průměru 0,3 mm).

Kolona se ohřívá v termostatu za programované teploty rychlostí 3 °C/min od teploty okolí do teploty 10 °C pod limitní hodnotu, při které dochází k rozložení stacionární fáze. Termostat se udržuje při této teplotě po dobu jedné hodiny, dokud nedojde k ustálení základní linie. Potom se termostat ochladí na 180 °C a pracuje se za isothermních podmínek.

Poznámka 6 Vhodné kondicionované kolony jsou obchodně dostupné.

- 3.1.5 Detektor; vhodnější je detektor vyhříváný na teplotu vyšší, než je teplota kolony.

3.2 Stříkačka

Stříkačka o maximálním objemu 10 μl, dělená po 0,1 μl.

3.3 Zapisovač

Jestliže je pro výpočet složení analyzované směsi použit záznam zapisovače, je nutno použít elektronický zapisovač s vysokou přesností, slučitelný s přístrojem. Zapisovač by měl mít následující charakteristiky:

- a) rychlost odezvy nižší než 1,5 s, výhodnější je 1 s (rychlost odezvy je doba nutná pro přeběh pera zapisovače z 0 % na 90 % při náhlém zavedení signálu 100 %),
- b) šířka papíru nejméně 20 cm,
- c) rychlost posunu papíru, nastavitelná na hodnoty mezi 0,4 cm/min až 2,5 cm/min.

3.4 Integrátor nebo kalkulátor (volitelný)

Rychlý a přesný výpočet může být proveden pomocí elektronického integrátoru nebo kalkulátoru. Ten má poskytovat lineární odezvu s odpovídající citlivostí a uspokojivou korekci na opravu základní linie.

▼ B

4. POSTUP

Postup popsaný v odstavcích 4.1 až 4.3 se týká použití plameno-ionizačního detektoru.

Může být použit plynový chromatograf vybavený detektorem pracujícím na principu tepelné vodivosti (katarometrem), který pracuje na principu změn tepelné vodivosti. Pracovní podmínky je třeba v tomto případě upravit tak, jak je uvedeno v bodu 6.

4.1 Zkušební podmínky

4.1.1 Výběr optimálních pracovních podmínek

4.1.1.1 Náplňové kolony

Při výběru pracovních podmínek je nutno přihlížet k následujícím proměnným:

- a) délka a průměr kolony;
- b) povaha a množství stacionární fáze;
- c) teplota kolony;
- d) průtok nosného plynu;
- e) požadované rozlišení;
- f) velikost nástřiku zvolená tak, aby sestava detektoru a elektrometru dávala lineární odezvu;
- g) trvání analýzy.

Obecně hodnoty uvedené v tabulkách 1 a 2 povedou k požadovaným výsledkům, tj. nejméně 2 000 teoretických pater na metr délky kolony pro methylstearát a jeho eluci v průběhu přibližně 15 minut.

Jestliže to přístrojové vybavení dovolí, měla by být teplota injektoru přibližně 200 °C a detektoru stejná nebo vyšší než je teplota kolony.

Platí pravidlo, že poměr průtoku vodíku přiváděného do plameno-ionizačního detektoru k průtoku nosného plynu by se měl pohybovat v rozmezí 1:2 až 1:1 v závislosti na průměru kolony. Průtok kyslíku by měl být 5krát až 10krát vyšší než průtok vodíku.

Tabulka 1

Vnitřní průměr kolony mm	Průtok nosného plynu ml/min
2	15 až 25
3	20 až 40
4	40 až 60

Tabulka 2

Koncentrace stacionární fáze % (m/m)	Teplota kolony °C
5	175
10	180
15	185
20	185

▼ B4.1.1.2 *Kapilární kolona*

Účinnost a permeabilita kapilární kolony způsobují, že dělení složek a doba trvání analýzy jsou značně závislé na průtoku nosného plynu kolonou. Je proto nezbytné optimalizovat pracovní podmínky působením na tyto parametry (nebo jednodušeji na tlakovou ztrátu na koloně) podle toho, zda je cílem zlepšit dělení, nebo zrychlit analýzu.

4.1.2 Stanovení počtu teoretických pater (účinnosti) a rozlišení (viz obrázek 1)

Provede se analýza směsi přibližně stejného množství methylstearátu a methyloléátu (např. methylestery z kakaového másla).

Teplota kolony a průtok nosného plynu se nastaví tak, aby maximum píku methylstearátu bylo zaznamenáno přibližně 15 minut po píku rozpouštědla. Použijte dostatečné množství směsi methylesterů, aby výška píku methylstearátu dosahovala přibližně tří čtvrtin rozsahu stupnice.

Počet teoretických pater n (účinnost) se vypočítá podle vzorce:

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

a rozlišení R podle vzorce:

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

kde

dr_1 je vzdálenost v mm od počátku chromatogramu do maxima píku methylstearátu;

ω_1 a ω_2 jsou šířky v mm píků methylstearátu a methyloléátu změřené mezi průsečíky tangent vedenými inflexními body na píku a základní linii;

Δ je vzdálenost mezi maximy píků methylstearátu a methyloléátu v mm;

▼ M2

a rozlišovací index I_r pomocí vzorce

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

kde

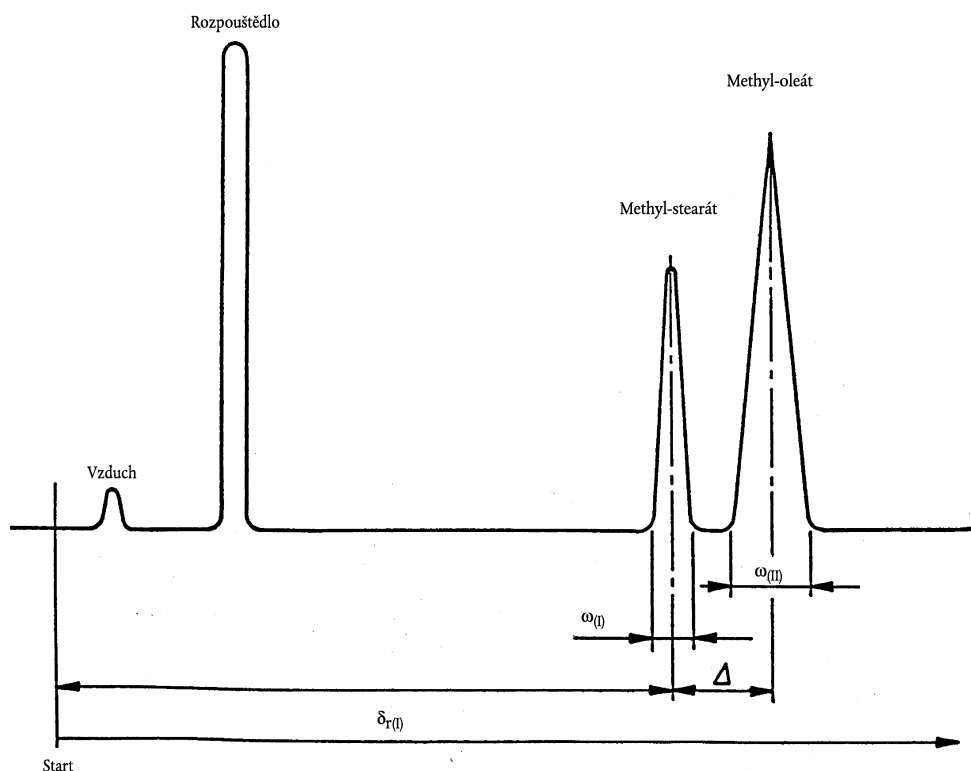
a = výška nejnižšího píku měřená od základní linie a

b = výška nejnižšího bodu sedla mezi dvěma sousedními píky měřená od základní linie.

▼ B

Obrázek 1

Chromatogram pro stanovení počtu teoretických pater (účinnosti) a rozlišení



Při stanovení by měly být nastaveny pracovní podmínky poskytující nejméně 2 000 teoretických pater na jeden metr délky kolony pro methylstearát a rozlišení nejméně 1,25.

4.2 Nástřik vzorku

Za použití stříkačky (3.2) se na kolonu chromatografu nastříkne 0,1 μl až 2 μl roztoku methylesterů připravených podle přílohy X B.

Pokud methylestery nejsou v roztoku, připraví se roztok přibližně 100 mg v 1 ml heptanu pro chromatografii a nastříkne se 0,1 μl až 1 μl tohoto roztoku.

Jestliže jsou analyzovány složky přítomné pouze ve stopových množstvích, velikost nástřiku může být zvýšena (až desetinásobně).

4.3 Analýza

Pracovní podmínky by měly být nastaveny podle odstavce 4.1.1.

Pokud jsou analyzovány mastné kyseliny s méně než 12 atomy uhlíku, lze pracovat při nižší teplotě. Při analýzách mastných kyselin s více než 20 atomy uhlíku lze pracovat naopak při teplotě vyšší. Je také možno použít v obou těchto případech programové teploty. Např. při analýze vzorku, který obsahuje methylestery mastných kyselin s méně než 12 atomy uhlíku nastříkujeme vzorek při teplotě 100 °C (nebo 50 °C až 60 °C, je-li přítomna kyselina másečná) a okamžitě se zvyšuje teplota rychlostí 4 °C/min až 8 °C/min až na optimální hodnotu. V některých případech mohou být oba postupy kombinovány.

▼ B

Po ukončení programovaném ohřevu pokračuje eluce při konstantní teplotě, dokud nejsou eluovány všechny složky. Jestliže přístroj není vybaven programováním teploty, je možno použít dvě teploty mezi 100 °C a 195 °C.

Jestliže je to nutné, je doporučeno provést analýzu na dvou zakotvených fázích o různé polaritě, aby byla ověřena nepřítomnost maskovaných píků, například v případě současného výskytu C_{18:3} a C_{20:0}, nebo C_{18:3} a konjugovaných C_{18:2}.

4.4 Příprava referenčního chromatogramu a referenčních grafů

Provádí se analýza referenční standardní směsi (2.3) za stejných pracovních podmínek, které byly použity při analýze vzorku, měřením retenčních časů nebo retenčních vzdáleností pro základní mastné kyseliny. Do semilografického grafu se vynesou logaritmy retenčních časů nebo vzdáleností pro jednotlivé stupně nasycenosti proti počtu atomů uhlíku. Za isothermních podmínek by měla být závislost pro kyseliny s rovným řetězcem stejného stupně nasycenosti lineární. Tyto přímky by měly být přibližně rovnoběžné.

Je nutné stanovit podmínky k vyvarování se přítomnosti „maskovaných píků“ v případě, že rozlišení je nedostatečné k rozdělení dvou složek.

5. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ**5.1 Kvalitativní analýza**

Provede se identifikace píků methylesterů pro vzorek z grafu podle 4.4; podle potřeby se interpoluje.

5.2 Kvantitativní analýza**5.2.1 Určení složení**

Až na výjimečné případy lze použít metody vnitřní normalizace, tj. za předpokladu, že všechny složky vzorku jsou zaznamenány na chromatogramu, představuje celková plocha píků 100 % (celková eluce).

Jestliže je přístroj vybaven integrátorem, použijí se výsledky získané tímto způsobem. Není-li integrátor k dispozici, vypočte se plocha každého píku vynásobením výšky píku šířkou píku v poloviční výšce a podle potřeby se použije ve výpočtu změna zeslabení použitá při záznamu chromatogramu.

5.2.2 Výpočet**5.2.2.1 Obecný případ**

Obsah složky *i* vyjádřený v hmotnostních procentech methylesterů se vypočítá určením plochy odpovídajícího píku vzhledem k součtu ploch všech píků podle vzorce:

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

kde

A_i je plocha píku odpovídající složce *i*,

$\sum A$ je součet ploch všech píků.

▼B

Výsledek se vypočítá s přesností na jedno desetinné místo.

Poznámka 7 V tomto obecném případě je výsledek založen na předpokladu, že plocha píku představuje hmotnostní procenta. V případech, že tento předpoklad neplatí, viz 5.2.2.2.

5.2.2.2 Použití korekčních faktorů

V některých případech, zvláště za přítomnosti mastných kyselin s méně než 8 atomy uhlíku, nebo kyselin se sekundární skupinou v případě použití detektoru pracujícího na principu tepelné vodivosti, nebo je-li požadována zvláště vysoká přesnost, by měly být použity korekční faktory k převedení plochy píku vyjádřené v procentech na hmotnostní procenta složek.

Určení korekčních faktorů za pomoci chromatogramu referenční směsi methylesterů známého složení se provádí za stejných pracovních podmínek, jaké byly použity při analýze vzorku.

Pro tyto referenční směsi se obsah v hmotnostních procentech vypočte podle vzorce:

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

kde

m_i je hmotnost složky i v referenční směsi,

$\sum m$ je celková hmotnost všech složek v referenční směsi.

Z chromatogramu referenční směsi (4.4) se vypočítá procentní podíl ploch (plocha/plocha) pro složku i takto:

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

kde

A_i je plocha píku odpovídající složce i ,

$\sum A$ součet ploch všech píků.

Korekční faktor se vypočítá podle vzorce

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

Obecně se korekční faktory vyjádří ve vztahu ke K_{C16} jako relativní faktor:

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

Pro vzorek se vyjádří obsah každé složky i v hmotnostních procentech methylesteru jako:

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

Výsledky se vypočítají s přesností na jedno desetinné místo.

▼ B

5.2.2.3 Použití vnitřního standardu

V některých případech (např. když nejsou kvantifikovány všechny mastné kyseliny, k čemuž dochází, jsou-li přítomny kyseliny se čtyřmi a šesti atomy uhlíku současně s kyselinami s 16 a 18 atomy uhlíku, nebo když je třeba určit absolutní množství mastných kyselin ve vzorku) by měl být použit vnitřní standard. Jako vnitřní standard se používají nejčastěji methylestery mastných kyselin s 5, 15 nebo 17 atomy uhlíku. Pro vnitřní standard by měl být stanoven korekční faktor (pokud se použije).

Hmotnostní procenta složky *i* vyjádřená jako methylester lze vypočítat podle vzorce:

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

kde

A_i je plocha píku odpovídající složce *i*,

A_s plocha píku odpovídající vnitřnímu standardu,

K'_i korekční faktor pro složku *i* (vztažený na K_{C16}),

K'_s korekční faktor pro vnitřní standard (vztažený na K_{C16}),

m hmotnost zkušební vzorku v mg,

m_s hmotnost vnitřního standardu v mg.

Výsledek se vypočítá s přesností na jedno desetinné místo.

▼ M2

6. ZVLÁŠTNÍ PŘÍPAD – STANOVENÍ TRANS-ISOMERŮ

Obsah trans-isomerů mastných kyselin s počtem atomů uhlíku mezi 10 až 24 je možné stanovit separací methylesterů pomocí kapilární plynové chromatografie s kolonami se specifickou polaritou.

- 6.1 Kapilární kolona z křemene o vnitřním průměru 0,25 až 0,32 mm a délce 50 m, potažená vrstvou kyanopropylsilikonu o tloušťce 0,1 až 0,3 μm (typ SP 2380, C. P. sil 88, silor 10 a podobné typy).

▼ M21

- 6.2 Methylestery se připraví postupem B uvedeným v další příloze X „B“. Tuky nebo oleje s obsahem volných kyselin vyšším než 3 % musí být dopředu neutralizovány v souladu s bodem 5.1.1 přílohy VII.

▼ M2

- 6.3 Laboratorní podmínky pro plynovou chromatografii jsou tyto:

- teplota kolony nastavitelná na teplotu od 150 do 230 °C (například 165 °C po dobu 15 minut a poté narůstající o 5 °C za minutu na 200 °C),
- teplota vstřikovací jednotky: 250 °C při nástřiku pomocí děliče (split type), nebo počáteční teplota kolony při použití systému nástřiku bez dělení přímo na kolonu (on column),

▼ M2

- teplota detektoru: 260 °C,
- rychlost průtoku nosného plynu (helium a vodík): 1,2 ml za minutu.

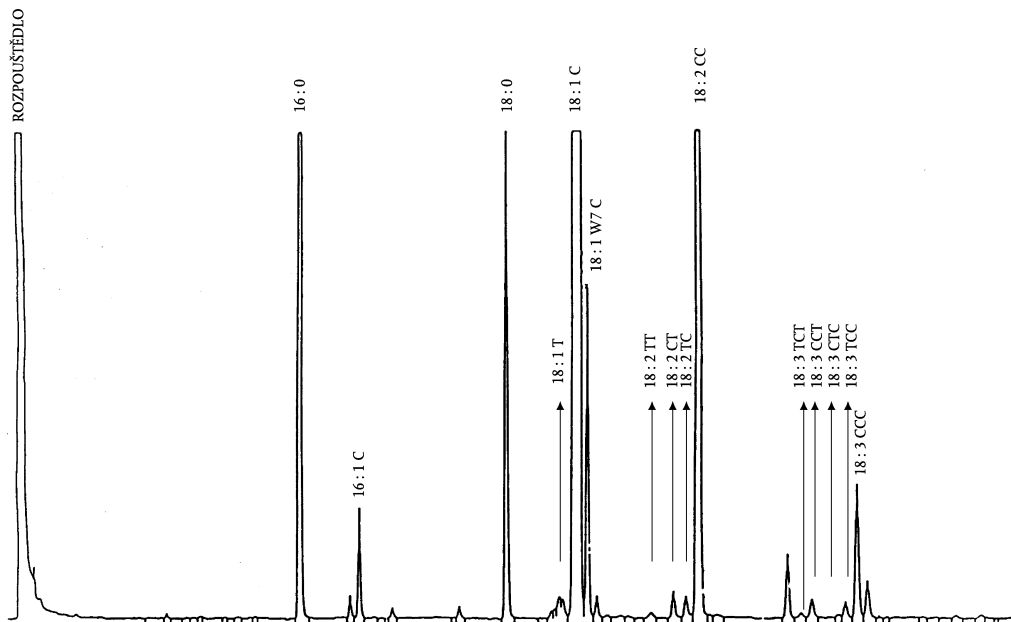
Vstříknuté množství musí být takové, aby za daných podmínek citlivosti byla výška píku odpovídajícího methylesteru kyseliny arachidové nejméně 20 % spodní části škály.

- 6.4 Stanovení jednotlivých methylesterů se provádí na základě retenčních časů, které jsou porovnány s retenčními časy referenčních směsí (viz bod 2.3.).

Estery trans-mastných kyselin se eluují před odpovídajícími cis-isomery. Příklad chromatogramu je uveden na obrázku 2.

Obrázek 2

Chromatogram pro stanovení trans-isomerů mastných kyselin pomocí kapilární plynové chromatografie



- 6.5 Účinnost kolony podle bodu 4.1.2. musí umožňovat separaci určitých kritických párů, například páru tvořeného masívem píků kyseliny trans-olejové a píkem kyseliny cis-olejové, trans- C18:1/cis- C18:1, s rozlišovacím indexem vyšším než 2.
- 6.6 Procentní podíl jednotlivých trans-mastných kyselin se vypočítá na základě vztahu mezi danými plochami píků a součtem ploch všech přítomných píků.

Pro jednotlivé kyseliny se berou v úvahu tyto procentní podíly:

- trans-oktadecenové kyseliny (T 18: 1) podle přílohy I k tomuto nařízení jako úhrn trans-isomerů kyseliny olejové,
- cis-trans- a trans-cis-oktadekadienové kyseliny [(CT/TC) 18: 2] podle přílohy I tohoto nařízení jako úhrn trans-isomerů kyseliny linolové,
- trans-cis-trans-, cis-cis-trans-, cis-trans-cis- a trans-cis-cis-oktadekatrienové kyseliny [(TCT + CCT + CTC + TCC)18: 3] podle přílohy I tohoto nařízení jako úhrn trans-isomerů

kyseliny linolenové.

▼ **M2**

Poznámka 8: S přihlédnutím ke zvláštním charakteristikám této metody je výsledek nutno uvádět na dvě desetinná místa.

▼ **B**

7. SPECIÁLNÍ PŘÍPAD: POUŽITÍ KATAROMETRU (DETEKTORU PRACUJÍCÍHO NA PRINCIPU ZMĚN TEPELNÉ VODIVOSTI)

Plynový chromatograf vybavený detektorem pracujícím na principu změn tepelné vodivosti (katarometr) může být rovněž použit pro kvalitativní a kvantitativní stanovení složení směsi methylesterů mastných kyselin. Při jeho použití by podmínky uvedené v odstavcích 3 a 4 měly být upraveny podle tabulky 3.

Pro kvantitativní analýzu je definováno použití korekčních faktorů v 5.2.2.2.

Tabulka 3

Proměnná	Hodnota/podmínka
Kolona	délka: 2 m až 4 m vnitřní průměr: 4 mm
Nosič	zrnění mezi 160 µm a 200 µm
Koncentrace stacionární fáze	15 % až 25 % (m/m)
Nosný plyn	Helium, nebo při jeho nedostatku vodík s co nejnižším obsahem kyslíku
Pomocné plyny	žádné
Teplota nástřiku	40 °C až 60 °C nad teplotu kolony
Teplota kolony	180 °C až 200 °C
Průtok nosného plynu	obvykle 60 ml/min až 80 ml/min
Nástřik vzorku	obvykle mezi 0,5 µl až 2 µl

8. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol musí obsahovat odkaz na použitou metodu pro přípravu methylesterů a jejich stanovení plynovou chromatografií a získané výsledky. Dále zahrnuje všechny pracovní podrobnosti nespécifikované v této mezinárodní normě nebo považované za volitelné, jakož i další okolnosti, které mohou ovlivnit výsledek.

Protokol musí obsahovat všechny informace nutné pro kompletní identifikaci vzorku.

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

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

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

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

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

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

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

(b) determination of the fatty acid composition:

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

— virgin olive oils with an acidity of less than 3,3 %,

— refined olive oil,

— olive oil (blend of virgin olive oils and refined olive oil),

— refined olive-pomace oil,

— olive-pomace oil (blend of virgin olive oils and refined olive-pomace oil);

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

— virgin olive oil with an acidity of more than 3,3 %,

— crude olive-pomace oil;

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

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

— virgin olive oils with an acidity of less than 3,3 %,

— refined olive oil,

— olive oil (blend of virgin olive oils and refined olive oil),

— refined olive-pomace oil,

— olive-pomace oil (blend of virgin olive oils and refined olive-pomace oil);

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

— virgin olive oil with an acidity of more than 3,3 %,

— crude olive-pomace oil.

▼ M19

PURIFICATION OF OIL SAMPLES

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

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

METHODS FOR PREPARING THE FATTY ACID METHYL ESTERS

1. Method A: Trans-esterification with cold methanolic solution of potassium hydroxide**1.1. Purpose**

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

1.2. Principle

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

1.3. Reagents

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

Heptane, chromatographic quality.

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

1.4. Apparatus

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

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

1.5. Procedure

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

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

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

2.2. Principle

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

2.3. Reagents

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

2.4. Apparatus

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

2.5. Procedure

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

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

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

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

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

2.6.1.2. Apparatus

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

— 1 and 2 ml graduated pipettes.

2.6.1.3. Reagents

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

Hexane, chromatographic quality.

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

2.6.1.4. Procedure

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

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

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

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

2.6.2. Method D**2.6.2.1. Principle**

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

2.6.2.2. Apparatus

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

▼ M19

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

2.6.2.3. Reagents

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

2.6.2.4. Procedure

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

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

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

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

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

3. Precision parameters

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

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

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

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

2. Calculations

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

Myristic (C14:0).

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

▼ M19

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

Margaric (C17:0).

Margaroleic (C17:1).

Stearic (C18:0).

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

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

Arachidic (C20:0).

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

Eicosenoic (C20:1).

Behenic (C22:0).

Lignoceric (C24:0).

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

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

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

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

▼ M19

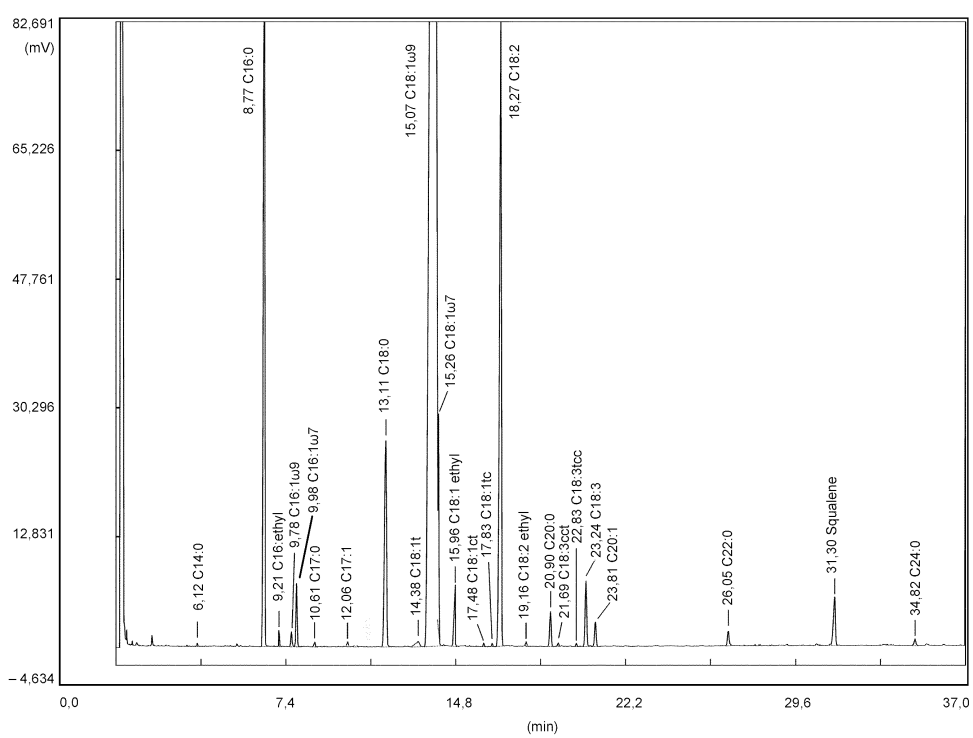


Figure 1: Gas chromatographic profile obtained by the cold methylation method from olive-pomace oil. The chromatographic peaks correspond to the methyl and ethyl esters except where otherwise indicated.

▼B

PŘÍLOHA XI

**STANOVENÍ OBSAHU TĚKAVÝCH HALOGENOVANÝCH
ROZPOUŠTĚDEL V OLIVOVÉM OLEJI**

1. PODSTATA

Tato metoda popisuje analýzu plynovou chromatografií s použitím techniky parního prostoru (*head space*).

2. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

2.1 Plynový chromatograf vybavený detektorem elektronového záchytu (ECD).

2.2 Zařízení pro přípravu vzorku v parním prostoru (*head space*).

2.3 Skleněná kolona pro plynovou chromatografií o délce 2 m a průměru 2 mm se stacionární fází tvořenou 10 % OV101 nebo ekvivalentem, zachycenou v kyselinou prané a silanizované křemelině s velikostí částic 80-100 mesh.

2.4 Nosný a pomocný plyn: dusík pro plynovou chromatografií, vhodný pro detektor elektronového záchytu.

2.5 Skleněné baňky na 10 až 15 ml s teflonovým povlakem a hliníkovým uzávěrem s vybavením pro vpich stříkačky.

2.6 Hermeticky těsnící svorky.

2.7 Plynová stříkačka na 0,5 až 2 ml.

3. CHEMIKÁLIE

Standard: halogenovaná rozpouštědla se stupněm čistoty vhodným pro plynovou chromatografií.

4. POSTUP

4.1 Do skleněné baňky se přesně naváží přibližně 3 g oleje (nesmí být použita opakovaně); baňka se hermeticky uzavře. Baňka se vloží na jednu hodinu do termostatu nastaveného na 70 °C. Pomocí stříkačky se opatrně odebere 0,2 až 0,5 ml z parního prostoru. Obsah stříkačky se nastříkne na kolonu chromatografu nastaveného takto:

— teplota vstříku: 150 °C,

— teplota kolony: 70 až 80 °C,

— teplota detektoru: 200 až 250 °C.

Mohou být použity i jiné teploty, pokud se dosáhne ekvivalentních výsledků.

4.2 Referenční roztoky: s použitím rafinovaného olivového oleje beze stop rozpouštědel se připraví standardní roztoky s různými koncentracemi těkavých halogenovaných rozpouštědel o hodnotách 0,05 mg/kg až 1 mg/kg. V případě potřeby se halogenovaná rozpouštědla rozředí pentanem.

4.3 Kvantitativní vyhodnocení: porovnejte plochy nebo výšky píků vzorku a standardního roztoku, jehož koncentrace se nejvíce blíží předpokládané koncentraci. Je-li odchylka větší než 10 %, analýza musí být opakována, tj. musí být provedeno porovnání s dalším standardním roztokem, dokud nebude odchylka menší než 10 %. Obsah se stanoví na základě průměru jednotlivých vstříků.

4.4 Vyjádření výsledků: v mg/kg (ppm). Detekční limit činí u této metody 0,01 mg/kg.

▼ **M22***PŘÍLOHA XII***METODA MEZINÁRODNÍ RADY PRO OLIVOVÝ OLEJ PRO ORGANOLEPTICKÉ HODNOCENÍ PANENSKÉHO OLIVOVÉHO OLEJE****1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ**

Tato metoda je založena na rozhodnutí Mezinárodní rady pro olivový olej č. DEC-21/95-V/2007 ze dne 16. listopadu 2007, které se týká upravené metody pro organoleptické hodnocení vlastností panenského olivového oleje. Jejím cílem je stanovit postup hodnocení organoleptických vlastností panenského olivového oleje ve smyslu bodu 1 přílohy XVI nařízení (ES) č. 1234/2007 a stanovit metodu jeho klasifikace na základě těchto vlastností. Metoda obsahuje rovněž pokyny týkající se nepovinného označování etiketami.

Popsaná metoda se vztahuje pouze na panenský olivový olej a na jeho klasifikaci nebo jeho označování etiketami podle intenzity vnímaných vad, ovocné chuti a vůně a dalších pozitivních znaků, které stanoví skupina vybraných vyškolených a vyzkoušených posuzovatelů tvořících zkušební komisi.

2. OBECNÉ INFORMACE

Pokud jde o obecný základní slovník, o výrazy zkušební místnost a skleněná nádobka pro hodnocení olivového oleje a všechny další otázky spojené s touto metodou, doporučuje se dodržovat pravidla Mezinárodní rady pro olivový olej, zejména rozhodnutí č. DEC-21/95-V/2007 ze dne 16. listopadu 2007, které se týká upravené metody pro organoleptické hodnocení vlastností panenského olivového oleje.

3. SPECIFICKÝ SLOVNÍK**3.1 Pozitivní znaky**

Ovocná chuť a vůně: soubor čichových a/nebo chuťových počítků, které závisí na odrůdě oliv a vlastnostech oleje pocházejícího ze zdravých a čerstvých plodů, zelených nebo zralých, a které jsou vnímány přímo nosem nebo retronasální metodou čichání.

Ovocná chuť a vůně se označuje za *nezralou*, pokud čichové počítky připomínají zelené plody, což je charakteristické pro olej získaný ze zelených plodů.

Ovocná chuť a vůně se označuje za *zralou*, pokud čichové počítky připomínají zralé plody, což je charakteristické pro olej získaný ze zelených a zralých plodů.

Hořký: základní charakteristická chuť oleje získaného ze zelených nebo nazelenalých oliv, kterou vnímáme hrazenými papilami, tvořícími na jazyku uskupení ve tvaru písmene V.

Štiplavý: taktilní počítek svrbění typický pro olivový olej vyrobený na začátku hospodářského roku převážně z ještě zelených oliv, možno jej vnímat v celé ústní dutině, zejména v hrdle.

3.2 Negativní znaky

Zatuchlý / Po kalném sedimentu: chuťově-čichový počítek typický pro olivový olej získaný z oliv skladovaných na hromadách, kde plody prošly pokročilým stupněm anaerobní fermentace, nebo pro olej získaný dekantací ze sedliny z kádí a podzemních nádrží, jež rovněž prošel procesem anaerobní fermentace.

Po plísňích a vlhkosti: chuťově-čichový počítek typický pro olivový olej získaný z oliv napadených plísňemi a kvasinkami v důsledku několikanásobného uskladnění ve vlhku.

▼ **M22**

Vinný-octový / Kyselý-nakyslý: chuťově-čichový počitek typický pro některý olivový olej připomínající víno nebo ocet. Vzniká hlavně v důsledku aerobního kvašení oliv nebo zbytků olivové pasty na lisovacích rohožích, které nebyly dobře umyté, což má za následek tvorbu kyseliny octové, ethylacetátu a ethanolu.

Kovový: chuťově-čichový počitek připomínající kov. Je typický pro olivový olej, který byl dlouhou dobu ve styku s kovovými povrchy během mletí, míchání, lisování nebo skladování.

Žluklý: chuťově-čichový počitek typický pro všechny oleje, které prodělaly intenzivní proces autooxidace.

Přehřátý nebo připálený: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný nadměrným a/nebo dlouhodobým ohřevem během zpracování, zejména je-li pasta míchána za nevhodných tepelných podmínek.

Trávový-dřevový: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný ze sušených oliv.

Hrubý: chuťově-taktilní počitek vyvolaný některým starým olejem, který způsobuje v ústech hustý, kašovitého pocit.

Olejový: chuťově-čichový počitek olivového oleje připomínající naftu, mazací tuky nebo minerální olej.

Po šťávě z plodů: chuťově-čichový počitek, který olej získá při dlouhodobém kontaktu se šťávou z plodů, která prošla procesem fermentace.

Slaný: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný z oliv, které byly konzervovány v solném roztoku.

Espartový: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný z oliv lisovaných v nových espartových rohožích. Může se lišit v závislosti na tom, zda byly rohože vyrobeny ze zeleného nebo sušeného esparta.

Zemitý: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný z oliv sklizených s nánosem zeminy nebo bláta a neopraných.

Po červech: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný z oliv, které byly silně napadeny larvami mouchy olivové (*Bactrocera Oleae*).

Po okurkách: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej po delší dobu hermeticky uzavřený, zejména do plechovek, pocházející z 2-6-nonadienalu.

Po vlhkém dřevu: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný z oliv, které byly na stromě zasaženy mrazem.

3.3 Nepovinná terminologie pro účely označování etiketami

Předseda zkušební komise může na požádání potvrdit, že hodnocené oleje splňují definice a rozpětí odpovídající těmto uvedeným pojmům a přívlastkům v závislosti na intenzitě a vnímání znaků:

a) pokud jde o pozitivní znaky uvedené v bodě 3.1 (*ovocná chuť a vůně*, případně označovaná jako *nezralá* nebo *zralá*, *štíplavý* a *hořký*):

- i) pojem „intenzivní“ se může použít, pokud je medián dotyčného znaku vyšší než 6,
- ii) pojem „střední“ se může použít, pokud je medián dotyčného znaku mezi 3 a 6,
- iii) pojem „lehký“ se může použít, pokud je medián dotyčného znaku nižší než 3,

▼ **M22**

- iv) dotyčné znaky se mohou použít bez odkazu na přívlastky uvedené v bodech i), ii) a iii), pokud je medián dotyčného znaku vyšší nebo rovný 3;
- b) pojem „vyvážený“ se může použít v případě oleje, který nevykazuje známky nevyváženosti. Nevyvážeností se rozumí čichový, chuťový a hmatový vjem oleje, ve kterém medián znaku *hořký* a/nebo znaku *štiplavý* je o dva body vyšší než medián znaku *ovocná chuť a vůně*;
- c) pojem „jemný olej“ se může použít v případě oleje, ve kterém je medián znaku *hořký* a znaku *štiplavý* nižší nebo rovný 2.

4. ZKUŠEBNÍ KOMISE

Zkušební komise se skládá z předsedy zkušební komise a z osmi až dvanácti posuzovatelů.

Předseda zkušební komise je kvalitně vyškolená osoba, která má nezbytné odborné znalosti pro posuzování jednotlivých druhů olivových olejů. Odpovídá za zkušební komisi, za její organizaci a činnost, za přípravu, kódové označení vzorků a jejich předkládání posuzovatelům, jakož i za sběr a statistické vyhodnocení zkušebních údajů.

Předseda zkušební komise vybere posuzovatele a dbá na jejich odbornou přípravu a kontrolu jejich výkonnosti, aby zajistil, že udržují své schopnosti na přiměřené úrovni.

Podle průvodce Mezinárodní rady pro olivový olej pro výběr, výcvik a kontrolu odborných posuzovatelů panenského olivového oleje musí být posuzovatelé pro organoleptické zkoušky olivového oleje vybráni a vyškoleni podle jejich schopností rozlišovat mezi podobnými vzorky.

Zkušební komise se musí zavázat k účasti na organoleptických hodnoceních na vnitrostátní úrovni, úrovni Společenství nebo mezinárodní úrovni za účelem pravidelné kontroly a harmonizace hodnotících kritérií. Kromě toho musí zkušební komise schválené v souladu s ustanoveními čl. 4 odst. 1 tohoto nařízení každoročně poskytovat dotyčnému členskému státu veškeré informace o svém složení a o počtu hodnocení provedených z titulu schválené zkušební komise.

5. POSTUP PŘI ORGANOLEPTICKÉM HODNOCENÍ A KLASIFIKACE

5.1 Používání profilového listu posuzovatelem

Profilový list, který posuzovatel použije, je uveden v dodatku A této metody.

Každý posuzovatel, který je členem zkušební komise, musí cítit a následovně ochutnat olivový olej, který je předmětem hodnocení. Na profilový list, který má k dispozici, musí dále uvést na 10cm stupnici pocíťovanou intenzitu všech pozitivních a negativních znaků⁽¹⁾. V případě, že posuzovatel vnímá zralost nebo nezralost znaku ovocné chuti a vůně, zaškrtně v profilovém listu příslušný rámeček.

Zjistí-li posuzovatel další negativní znaky neuvedené na profilovém listu, zapíše je s použitím termínu nebo termínů, které je co nejpřesněji popisují, v rubrice „jiné“.

⁽¹⁾ Posuzovatel může odmítnout ochutnávání oleje, pokud při přímém čichovém vnímání zaznamená, že některý z negativních znaků je extrémně intenzivní. Do profilového listu zaznamená tuto výjimečnou okolnost.

▼ **M22****5.2 Použití údajů předsedou zkušební komise**

Předseda zkušební komise shromáždí profilové listy vyplněné jednotlivými posuzovateli; zkontroluje intenzity přidělené různým znakům; v případě, že bude zjištěna nesrovnalost, vyzve posuzovatele, aby svůj profilový list zkontroloval a v případě nutnosti zkoušku zopakoval.

Předseda komise může zadat údaje jednotlivých posuzovatelů do počítačového programu pro metodu statistického výpočtu mediánu uvedenou v dodatku B. Údaje se zadávají pomocí matice složené z deseti sloupců odpovídajících deseti organoleptickým vlastnostem a z počtu řádků odpovídajících počtu posuzovatelů zkušební komise.

Pokud více než 50 % členů zkušební komise vnímalo negativní znak a uvedlo to v rubrice „jiné“, vypočítá se medián této vady a olej se následně klasifikuje.

Pokud jde o pojmy „nezralý“ a „zralý“, předseda zkušební komise může potvrdit, že hodnocený olej splňuje podmínky uvedené v bodě 3.3 pouze v tom případě, pokud minimálně 50 % členů zkušební komise upozornilo na vnímání zralosti nebo nezralosti u znaku ovocné chuti a vůně.

V případě analýz, které se provádějí v rámci kontrol shody, je provedena zkouška. V případě kontrolních analýz musí předseda zkušební komise zabezpečit, aby se analýza opakovala. V případě, že se výsledky analýz vzájemně vylučují, se hodnocení musí provést třikrát. V těchto případech se medián znaků vypočítá na základě průměru mediánů. Všechna opakování těchto analýz se musí provést během odlišných zasedání.

5.3 Klasifikace olivových olejů

Olivový olej se zařadí pod následující kategorie podle mediánu vad a mediánu znaku ovocné chuti a vůně. Medián vad se stanovuje jako medián vady vnímané s největší intenzitou. Medián vad a medián ovocné chuti a vůně jsou vyjádřeny s přesností na jedno desetinné číslo a hodnota robustního variačního koeficientu, který je vyjadřuje, musí být nižší nebo rovná 20 %.

Klasifikace oleje se provádí porovnáváním hodnoty mediánu vad a mediánu ovocné chuti a vůně s níže uvedenými referenčními intervaly. Při stanovování hranice těchto intervalů se zohlednila chyba metody, proto se tyto hranice považují za absolutní. Počítačové programy umožňují vizuální klasifikaci v tabulce statistických údajů nebo na grafu.

- a) Extra panenský olivový olej: medián vad se rovná 0 a medián ovocné chuti a vůně a vůně je vyšší než 0;
- b) Panenský olivový olej: medián vad je vyšší než 0 a nižší nebo rovný 3,5 a medián ovocné chuti a vůně je vyšší než 0;
- c) Lampantový panenský olivový olej: medián vad je vyšší než 3,5; nebo medián vad je nižší nebo rovný 3,5 a medián ovocné chuti a vůně se rovná 0.

5.4 Zvláštní případ

Pokud medián jiného pozitivního znaku než chuť a vůně je vyšší než 5,0, předseda zkušební komise tuto skutečnost uvede do protokolu o zkoušce olejového oleje.

▼ **M22***Dodatek A***Profilový list panenského olivového oleje**

INTENZITA VNÍMÁNÍ VAD

Zatuchlý / Po kalném sedimentu | _____ →

Plesnivý – vlhký – zemitý | _____ →

Vinný – octový – kyselý – nakyslý | _____ →

Kovový | _____ →

Žluklý | _____ →

Jiné nepřípustné znaky (specifikujte) | _____ →

INTENZITA VNÍMÁNÍ POZITIVNÍCH ZNAKŮ

Ovocná chuť a vůně | _____ →
Nezralý Zralý

Hořký | _____ →

Štiplavý | _____ →

Jméno posuzovatele:**Kód vzorku:****Datum:****Poznámky:**

▼ **M22***Dodatek B*

METODA VÝPOČTU MEDIÁNU A INTERVALY SPOLEHLIVOSTI

Medián

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

Medián je definován jako reálné číslo X_m , pro které platí, že pravděpodobnost (P), že hodnoty rozdělení (X) jsou nižší než toto číslo (X_m), je nižší nebo rovná 0,5 a zároveň, že pravděpodobnost, že hodnoty rozdělení jsou nižší nebo rovné X_m , je vyšší nebo rovná 0,5. Jiná definice považuje medián za padesátý percentil rozdělení čísel seřazených podle vzestupného pořadí. Zjednodušeně řečeno: medián představuje prostřední hodnotu řady složené z lichých čísel nebo průměr dvou prostředních hodnot řady složené ze sudých čísel.

Robustní směrodatná odchylka

Za účelem získání spolehlivého odhadu variability, která se vytváří kolem mediánu, je třeba použít robustní směrodatné odchylky podle Stuarta a Kendalla. Následující vzorec uvádí odchylku asymptotického typu, tj. robustní odhad variability zvažovaných údajů, kde N je počet pozorování a IQR je mezikvartilové rozpětí, které obsahuje přesně 50 % případů jakéhokoli rozdělení pravděpodobnosti.

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

Výpočet mezikvartilového rozpětí se provádí výpočtem velikosti rozdílu odchylky mezi 75. a 25. percentilem.

$$\text{IQR} = 75. \text{ percentil} - 25. \text{ percentil}$$

Percentil je hodnota X_{pc} pro kterou platí, že pravděpodobnost (P), že hodnoty rozdělení jsou nižší než X_{pc} , je nižší nebo rovná stanovené setině a zároveň, že pravděpodobnost (P), že hodnoty rozdělení jsou nižší nebo rovné X_{pc} , je vyšší nebo rovná uvedené setině. Setina označuje použitý zlomek rozdělení. U mediánu se tento zlomek rovná 50/100.

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

V praxi představuje percentil hodnotu rozdělení, která odpovídá určené ploše vyznačené od křivky rozdělení nebo hustoty. Například 25. percentil představuje hodnotu rozdělení odpovídající ploše, která se rovná 0,25 nebo 25/100.

Robustní variační koeficient (%)

Robustní variační koeficient (CVR) představuje bezrozměrné číslo, které udává procento variability analyzované řady čísel. Z tohoto důvodu je tento koeficient velice užitečný pro ověření spolehlivosti členů zkušební komise.

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

▼ M22**95 % intervaly spolehlivosti mediánu**

95 % intervaly spolehlivosti (hodnota chyby prvního druhu se rovná 0,05 nebo 5 %) představují interval, v němž by se hodnota mediánu mohla měnit za předpokladu, že by bylo možné pokus donekonečna opakovat. V praxi tento interval označuje interval proměnlivosti pokusu za stanovených provozních podmínek za předpokladu, že by se pokus mohl vícekrát opakovat. Stejně jako v případě CVR interval napomáhá při hodnocení spolehlivosti pokusu.

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

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

Kde se c , v případě intervalu spolehlivosti 0,95, rovná 1,96.

▼ M20

▼ M19

▼B*PŘÍLOHA XV***1. STANOVENÍ OBSAHU OLEJE V OLIVOVÝCH POKRUTINÁCH****1.1 Přístroje a pomcky**

- vhodný extrakční přístroj, vybavený baňkami o objemu 200 ml až 250 ml,
- elektricky vyhřívaná lázeň (písková, vodní apod.) nebo topná deska,
- analytické váhy,
- laboratorní sušárna nastavitelná nejvýše na teplotu 80 °C,
- elektricky vyhřívaná sušárna s termostatickou kontrolou, schopná udržovat teplotu 103 ± 2 °C a zabezpečující provoz při atmosférickém nebo při sníženém tlaku,
- mechanický mlýnek, lehce čistitelný a umožňující rozemletí olivových pokrutin bez jejich zahřátí nebo významné změny vlhkosti a obsahu těkavých látek nebo obsahu oleje,
- extrakční patrony a bavlněná vata nebo filtrační papír, vše prosté látek rozpustných v hexanu,
- exsikátor,
- síto o velikosti otvorů 1 mm,
- pemza, ve formě drobných kousků, nebo jiný granulát zabraňující bouřlivému varu, předem vysušený.

1.2 Chemikálie

Technický hexan, jehož odparek nesmí být větší než 2 mg na 100 ml rozpouštědla.

2. POSTUP**2.1 Příprava zkušební vzorku**

V případě potřeby se k rozemletí laboratorního vzorku použije předem dobře vyčištěný mechanický mlýnek, aby částice zcela prošly sítím.

Asi jedna dvacatina vzorku se použije pro vyčištění mlýnku; tento rozemletý materiál se vyhodí. Zbytek se rozeeme a shromáždí, důkladně promíchá a neprodleně analyzuje.

2.2 Velikost zkušební vzorku

Po dokončení mletí se naváží asi 10 g vzorku s přesností na 0,01 g.

2.3 Příprava extrakční patrony

Zkušební vzorek se převede do extrakční patrony a utěsni se vatovým tamponem. Je-li použit filtrační papír, zkušební vzorek se do něj zabalí.

2.4 Vysušení předem

Jsou-li olivové pokrutiny velmi vlhké (tj. vlhkost a obsah těkavých látek je vyšší než 10 %), provede se vysušení předem umístěním naplněné extrakční patrony (nebo filtračního papíru) na vhodnou dobu do sušárny vyhřáté na teplotu nejvýše 80 °C, aby došlo ke snížení vlhkosti a obsahu těkavých látek na hodnotu menší než 10 %.

▼ B**2.5 Příprava extrakční baňky**

Extrakční baňka s několika kousky pemzy, která byla předem vysušena v sušárně při teplotě 103 ± 2 °C a zchlazena po dobu nejméně 1 hodiny v exsikátoru, se zváží s přesností na 1 mg.

2.6 První extrakce

Extrakční patrona (nebo filtrační papír) se zkušebním vzorkem se vloží do extrakčního přístroje. Do baňky se nalije potřebné množství hexanu. Extrakční baňka se nasadí na extrakční přístroj a to celé se umístí na elektricky vyhřívanou lázeň. Extrakční baňka se zahřívá tak, aby kondenzace extrakčního rozpouštědla byla nejméně 3 kapky za sekundu (tzn. mírný, ne prudký var). Extrahuje se 4 hodiny. Potom se extrakční přístroj nechá vychladnout. Extrakční patrona se vyjme z extrakčního přístroje a postaví se do proudu vzduchu, aby se odpařila většina rozpouštědla.

2.7 Druhá extrakce

Obsah extrakční patrony se vysype do mikromlýnku a co nejjemněji se rozemele. Rozemletá směs se převede zpět do extrakční patrony, která se vloží zpět do extrakčního přístroje.

Znovu se extrahuje další dvě hodiny do téže extrakční baňky, obsahující již prvou část extraktu.

Roztok obsažený v extrakční baňce musí být čirý. Není-li tomu tak, je nutno jej přefiltrovat přes filtrační papír, přičemž původní baňka a filtrační papír se několikrát propláchnou hexanem. Filtrát a proplachovací rozpouštědlo se převede do druhé předem vysušené baňky zvážené s přesností na 1 mg.

2.8 Odstranění rozpouštědla a vážení extraktu

Větší část rozpouštědla se z extrakční baňky odstraní oddestilováním na elektricky vyhřívané lázni. Poslední stopy rozpouštědla se odstraní zahříváním extrakční baňky po dobu 20 minut v sušárně při 103 ± 2 °C. Zbytku rozpouštědla se mohou odstranit proudem vzduchu, anebo výhodněji inertním plynem zaváděným do baňky po krátkou dobu, nebo pod vakuem.

Baňky s vyextrahovaným olejem se nechají vychladnout na okolní teplotu po dobu nejméně jedné hodiny a zváží se s přesností na 1 mg.

Zvážené baňky se za stejných podmínek znovu zahřívají po dobu 10 minut, opět se nechají vychladnout v exsikátoru a znovu se zváží.

Rozdíl mezi dvěma váženými nesmí být vyšší než 10 mg. Pokud je rozdíl vyšší, opakuje se zahřívání, vychlazení a vážení tak dlouho, dokud rozdíl mezi dvěma po sobě následujícími váženými je nejvýše 10 mg. Potom se zaznamená konečná hmotnost baňky.

Na stejném zkušebním vzorku se vždy provedou dvě zkoušky;.

3. VYJÁDRĚNÍ VÝSLEDKŮ**3.1 Metoda výpočtu a vzorec**

a) Extrakt z původního produktu vyjádřený jako procento hmotnostní se vypočítá takto:

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

▼ B

kde S = procento hmotnostní extraktu z původního produktu,
 m_0 = hmotnost zkušebního vzorku v g,
 m_1 = hmotnost extraktu po vysušení v g.

Za výsledek se považuje aritmetický průměr dvou stanovení za předpokladu, že jsou splněny požadavky na opakovatelnost.

Výsledek se uvádí s přesností na jedno desetinné místo.

b) Extrakt jako procento hmotnostní v sušině se vypočítá takto:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{extrakt v \% tuku v sušině}$$

kde S = procento hmotnostní extraktu z půdního produktu,
 U = jeho vlhkost a obsah těkavých látek.

3.2 Opakovatelnost

Absolutní rozdíl mezi dvěma jednotlivými na sobě nezávislými výsledky zkoušky, získanými stejným pracovníkem v rozmezí krátkého časového intervalu nebo souběžně může činit nejvýše 0,2 g hexanového extraktu na 100 g zkušebního vzorku.

Pokud je rozdíl větší, analýza se opakuje na dalších dvou zkušebních vzorcích. Pokud je rozdíl opět vyšší než 0,2 g, za výsledek se považuje aritmetický průměr všech čtyřech stanovení.



PŘÍLOHA XVI

STANOVENÍ JODOVÉHO ČÍSLA

1. OBLAST PŮSOBNOSTI

Tato mezinárodní norma specifikuje metodu stanovení jodového čísla v živočišných a rostlinných tucích a olejích, dále jen „tuky“.

2. DEFINICE

Pro účely této mezinárodní normy platí tato definice:

2.1 *Jodové číslo*: vyjadřuje hmotnost jodu vázaného na vzorek za pracovních podmínek specifikovaných touto mezinárodní normou.

Jodové číslo je vyjádřeno v g jodu na 100 g vzorku.

3. PODSTATA ZKOUŠKY

Zkušební vzorek se rozpustí v rozpouštědle a přidá se Wijsovo činidlo. Po stanoveném čase se přidá roztok jodidu draselného a voda a uvolněný jod se titruje roztokem thiosíranu sodného.

4. CHEMIKÁLIE

Všechna činidla musí mít čistotu p. a.

4.2 Jodid draselný, 100 g/l roztoku; nesmí obsahovat volný jod nebo jodičnany.

4.3 Škrobový roztok.

5 g rozpustného škrobu se smísí se 30 ml vody a ke směsi se přidá 1 000 ml vroucí vody, vaří se tři minuty a roztok se nechá vychladnout.

4.4 Thiosíran sodný, standardní odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, standardizovaný ne déle než 7 dnů před použitím.

4.5 Rozpouštědlo připravené smícháním stejných objemů cyklohexanu a kyseliny octové.

4.6 Wijsovo činidlo, obsahující jodmonochlorid v kyselině octové. Doporučuje se použít Wijsovo činidlo obchodně dostupné.

Poznámka: Činidlo obsahuje 9 g ICl_3 + 9 g I v kyselině octové.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Běžné laboratorní vybavení, a zejména:

5.1 Skleněná váženka, odpovídající hmotnosti zkušební vzorku a hodící se do baňky (5.2).

5.2 Erlenmeyerovy baňky na 500 ml se skleněnou zabroušenou zátkou, dokonale vysušené.

6. PŘÍPRAVA ZKUŠEBNÍHO VZORKU

Homogenizovaný vzorek se vysuší síranem sodným a přefiltruje.

7. POSTUP ZKOUŠKY

7.1 Zkušební vzorek

Hmotnost zkušební vzorku se liší podle očekávaného jodového čísla, viz tabulka 1.

▼ B

Tabulka 1

Očekávané jodové číslo	Hmotnost zkušební vzorku v g
Méně než 5	3,00
5 až 20	1,00
21 až 50	0,40
51 až 100	0,20
101 až 150	0,13
151 až 200	0,10

Zkušební vzorek se navažuje s přesností 0,1 mg do skleněné váženky (5.1).

7.2 Stanovení

Váženka se zkušebním vzorkem se vloží do 500ml baňky (6.2). Přidá se 20 ml rozpouštědla (4.5), a tuk se rozpustí. Přidá se přesně 25 ml Wijsova činidla (4.6), baňka se uzavře zátkou, obsah se promíchá a baňka se umístí na tmavé místo. Pipetování Wijsova činidla se neprovádí ústy.

Stejným způsobem se připraví slepý pokus s přidavkem rozpouštědla a Wijsova činidla, ale vynechá se zkušební vzorek.

Pro vzorky s jodovým číslem nižším než 150 se baňka ponechá 1 hodinu v temnotě, pro vzorky s jodovým číslem nad 150, pro polymerované výrobky a výrobky ve značné míře oxidované je nutno dobu prodloužit na 2 hodiny.

Po této době se do každé baňky přidá 20 ml roztoku jodidu draselného (4.2) a 150 ml vody (4.1).

Obsah baňky se titruje standardním odměrným roztokem thiosíranu sodného (4.4), dokud téměř nezmizí žluté zbarvení jodu. Potom se přidá několik kapek škrobového roztoku (4.3) a pokračuje se v titraci, dokud po intenzivním protřepání nezmizí modré zbarvení.

Poznámka: Přípouští se stanovení bodu ekvivalence potenciometrickou indikací.

7.3 Počet stanovení

Z jednoho zkušební vzorku se provádějí dvě stanovení.

8. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

Jodové číslo se vypočítá podle vzorce:

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

kde

c = přesná koncentrace standardního odměrného roztoku thiosíranu sodného (4.4) v mol/l,

V₁ = objem použitého standardního odměrného roztoku thiosíranu sodného (4.4) na slepý pokus v ml,

▼B

V_2 = objem použitého standardního odměrného roztoku thiosíranu sodného (4.4) pro vlastní stanovení v ml,

m = hmotnost zkušebního vzorku v g (7.1).

Jako výsledek se uvádí aritmetický průměr dvou stanovení za předpokladu, že je splněna podmínka opakovatelnosti.

▼ **M11***PŘÍLOHA XVII***METODA PRO STANOVENÍ STIGMASTADIENOLŮ V ROSTLINNÝCH OLEJÍCH**

1. ÚČEL

Stanovení stigmastadienolů v rostlinných olejích obsahujících nízké koncentrace těchto uhlovodíků, zejména v panenském olivovém oleji a surovém olivovém oleji z pokrutin.

2. OBLAST PŮSOBNOSTI

Tato norma může být použita pro všechny rostlinné oleje, ačkoliv měření jsou spolehlivá jedině tehdy, leží-li obsah těchto uhlovodíků mezi 0,01 a 4,0 mg/kg. Metoda je obzvláště vhodná pro zjišťování přítomnosti rafinovaných rostlinných olejů (olivového oleje, olivového oleje z pokrutin, slunečnicového oleje, palmového oleje atd.) v panenském olivovém oleji, protože na rozdíl od panenských olejů rafinované oleje obsahují stigmastadienoly.

3. PODSTATA METODY

Izolace nezmýdelnitelného extraktu. Separace steroidové uhlovodíkové frakce kolonovou chromatografií na silikagelu a analýza pomocí kapilární plynové chromatografie.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 250 ml baňky pro použití se zpětným chladičem.

4.2 Dělicí nálevky na 500 ml.

4.3 100 ml baňky s kulatým dnem.

4.4 Rotační odpařovač.

4.5 Skleněná chromatografická kolona (vnitřní průměr 1,5 až 2,0 cm, délka 50 cm) s teflonovým kohoutem a se dnem se zátkou ze skelné vaty nebo s kotoučem ze sintrovaného skla. Za účelem připravení silikagelové kolony se do chromatografické kolony nalije hexan do výšky přibližně 5 cm a poté se kolonu naplní suspenzí tvořenou 15 g silikagelu a ve 40 ml hexanu pomocí dávek hexanu. Nechá se úplně usadit pomocí mírných vibrací. Přidá se bezvodý siran sodný do výšky přibližně 0,5 cm a nadbytečný hexan se nakonec eluuje.

4.6 Plynový chromatograf s plameno-ionizačním detektorem, vstřikovacím systémem pro nástřik pomocí děliče nebo studeným vstřikovacím systémem typu on-column a termostatickou komorou, nastavitelnou na požadovanou teplotu s přesností ± 1 °C.

4.7 Kapilární kolona z taveného křemene pro plynovou chromatografii (vnitřní průměr 0,25 nebo 0,32 mm, délka 25 m) potažená 5 % fenylmethylsilikonem o tloušťce filmu 0,25 mm.

Poznámka 1:

Mohou být použity jiné kolony s podobnou nebo nižší polaritou.

4.8 Zapisovač s integrátorem s možností integrace mezi dvěma minimálními hodnotami.

4.9 Mikrostříkačka na 5 až 10 ml pro plynovou chromatografii opatřená tvrzenou jehlou.

4.10 Elektrický ohřívací plášť nebo topná deska.

▼ M11

5. ČINIDLA

Všechna činidla musí být čistoty p. a., není-li uvedeno jinak. Používá se destilovaná voda nebo voda přinejmenším ekvivalentní čistoty.

- 5.1 Hexan nebo směs alkanů s bodem varu v rozmezí od 65 do 70 °C, destilované v rektifikační koloně.

Poznámka 2:

Rozpouštědlo musí být destilováno za účelem odstranění nečistot.

- 5.2 96 % ethanol (V/V).

- 5.3 Bezvodý síran sodný.

- 5.4 10 % alkoholový roztok hydroxidu draselného. 10 ml vody se přidá k 50 g hydroxidu draselného, zamíchá se a doplní se ethanolem na objem 500 ml.

Poznámka 3:

Stáním alkoholový uhličitán draselný hnědne. Měl by být připraven každý den čerstvý a uchováván v dobře uzavřených lahvích z tmavého skla.

- 5.5 Silikagel 60 pro kolonovou chromatografii, s velikostí částic 70-230 mesh (Merck, č. zboží 7734 apod.).

Poznámka 4:

Obvykle může být silikagel použit přímo z balení bez jakékoli úpravy. Některé šarže silikagelu však mohou vykazovat nízkou aktivitu, která vede k neuspokojivým chromatografickým separacím. V takových případech je nutno postupovat takto: silikagel se aktivuje nejméně 4hodinovým zahříváním na teplotu 550 °C. Po zahřátí se silikagel vloží do exsikátoru a po vychladnutí se převede do uzavíratelné baňky. Přidá se 2 % vody a protřepává se, dokud nezmizí hrudky a dokud se prášek volně nepřesypá.

Šarže silikagelů, jejichž výsledkem jsou chromatogramy se vzájemně se překrývajícími píky, je nutno upravit výše uvedeným způsobem. Jinou alternativou může být použití extra čistého silikagelu 60 (Merck, č. zboží 7754).

- 5.6 Zásobní roztok (200 ppm) cholesta-3, 5-dienu (Sigma, 99 % čistoty) v hexanu (10 mg v 50 ml).

- 5.7 Standardní roztok cholesta-3, 5-dienu v hexanu o koncentraci 20 ppm získaný naředěním výše uvedeného roztoku.

Poznámka 5:

Roztoky 5.6 a 5.7 uchovávané při teplotě do 4 °C jsou stabilní po dobu nejméně čtyř měsíců.

- 5.8 Roztok n-nonakosanu v hexanu o koncentraci přibližně 100 ppm.

- 5.9 Nosný plyn pro chromatografii: helium nebo vodík o 99,9990 % čistotě.

- 5.10 Pomocné plyny pro plameno-ionizační detektor: vodík o 99,9990 % čistotě a čistý vzduch.

▼ M11**6. POSTUP****6.1 Příprava nezmýdelnitelných látek**

- 6.1.1 Do 250ml baňky (4.1) se naváží $20 \pm 0,1$ g oleje, přidá se 1 ml standardního roztoku cholesta-3, 5-dienu (20 μ g) a 75 ml 10 % alkoholového roztoku hydroxidu draselného, připojí se zpětný chladič a zahřívá se na mírný var po dobu 30 minut. Baňka obsahující vzorek se odstraní ze zdroje tepla a roztok se nechá mírně vychladnout (nenechá se vychladnout úplně, protože vzorek by se usadil). Přidá se 100 ml vody a roztok se převede do dělicí nálevky (4.2) pomocí 100 ml hexanu. Směs se po 30 sekund energicky protřepe a nechá se stát až do separace fází.

Poznámka 6:

Pokud vznikne emulze, která hned znovu nezmizí, přidávají se malá množství ethanolu.

- 6.1.2 Spodní vodná fáze se převede do druhé dělicí nálevky a znovu se extrahuje 100 ml hexanu. Spodní fáze se nechá znovu vypustit a hexanové extrakty (smíchané v jiné dělicí nálevce) se třikrát properou pokaždé 100 ml směsi ethanolu a vodu (1:1), dokud se nedocílí neutrální hodnoty pH.
- 6.1.3 Hexanový roztok se nechá projít bezvodým síranem sodným (50 g), propere se 20 ml hexanu a odpaří se v rotačním odpařovači do sucha při 30 °C a za sníženého tlaku.

6.2 Separace steroidové uhlovodíkové frakce

- 6.2.1 Zbytek se převede do rektifikační kolony pomocí dvou 1ml množství hexanu, vzorek se zavede do kolony tak, že se hladina roztoku nechá poklesnout na úroveň síranu sodného, a zahájí se chromatografická eluce s hexanem s rychlostí průtoku přibližně 1 ml/min. Prvních 25 až 30 ml eluátu se vyhodí a použije se dalších 40 ml frakce. Tato frakce se převede do 100ml baňky s kulatým dnem (4.3).

Poznámka 7:

První frakce obsahuje nasycené uhlovodíky (obrázek 1a) a druhá frakce steroidové uhlovodíky. Další eluce poskytuje squalen a příbuzné sloučeniny. Pro dosažení dobré separace nasycených a steroidových uhlovodíků je nutná optimalizace objemů frakcí. Za tímto účelem je nutno objem první frakce upravit tak, aby při analýze druhé frakce byly píky reprezentující nasycené uhlovodíky nízké (viz obrázek 1c). Pokud se žádné takové píky neobjeví, avšak standardní píky mají zároveň pouze omezenou velikost, je třeba objem první frakce snížit. Úplná separace složek první a druhé frakce navíc není nutná, poněvadž během analýzy plynovou chromatografií za podmínek popsanych v bodě 6.3.1 nedochází k žádnému překrývání pík. Optimalizace objemu druhé frakce není zpravidla nutná, protože další složky se dobře separují. Nicméně přítomnost většího píku s retenčním časem přibližně o 1,5 minuty nižším než u standardu je způsobena squalenem a svědčí o špatné separaci.

- 6.2.2 Druhá frakce se zcela odpaří v rotačním odpařovači při 30 °C v mírném vakuu a zbytek se rozpustí neprodleně v 0,2 ml hexanu. Roztok se až do analýzy uchovává v ledničce.

Poznámka 8:

Zbytky 6.1.3 a 6.2.2 by neměly být přechovávány v suchém stavu a při pokojové teplotě. Jakmile jsou zbytky získány, je nutno k nim přidat neprodleně rozpouštědla a roztoky uchovávat v ledničce.

▼ **M11****6.3 Plynová chromatografie**

6.3.1 Pracovní podmínky pro nástřik pomocí děliče:

- teplota vstřikovací komůrky: 300 °C,
- teplota detektoru: 320 °C,
- integrátor se zapisovačem: parametry pro integraci by měly být zvoleny tak, aby se správně určily plochy píků. Doporučuje se integrace mezi dvěma minimy,
- citlivost: zhruba 16násobek nejmenšího útlumu,
- množství nastříknutého roztoku: 1 µl roztoku,
- programu termostatu: 6minutová izoterma o hodnotě 235 °C, potom nárůst na teplotu 285 °C rychlostí 2 °C/min,
- vstřikovací komůrka s rozdělovačem toku (dělicí poměr 1:15),
- nosný plyn: helium nebo vodík o tlaku asi 120 kPa.

Tyto podmínky mohou být upraveny podle specifikací chromatografu a kolony tak, aby poskytly chromatogramy splňující následující podmínky: pík vnitřního standardu se musí objevit během pěti minut před, nebo po čase uvedeném v bodu 6.3.2 a musí dosáhnout nejméně 80 % plného rozsahu stupnice.

Systém plynové chromatografie je nutno přezkoušet nástřikem směsi zásobního roztoku cholestadienu (5.6) a roztoku n-nonakosanu (5.8). Pík cholesta-3, 5-dienu se musí objevit dříve, než pík n-nonakosanu (obrázek 1c). Pokud se neobjeví, je možno snížit teplotu termostatu a/nebo nahradit kolonu pro plynovou chromatografii kolonou s nižší polaritou.

6.3.2 Identifikace píků

Pík vnitřního standardu se objeví přibližně za 19 minut a píky stigmastadienolů s relativním retenčním časem přibližně 1,29 (viz obrázek 1b). Stigmasta-3, 5-dien se objevuje s malými množstvími izomeru a obvykle se obě tyto látky eluují současně jako jediný pík. Je-li však kolona příliš polární nebo vykazuje-li vysokou rozlišovací schopnost, může se izomer objevit jako malý pík těsně před píkem stigmasta-3, 5-dienu (obrázek 2). Aby byla zajištěna eluce stigmastadienolů jako jednoho píku, doporučuje se nahradit kolonu kolonou s nižší polaritou, nebo kolonou s větším vnitřním průměrem.

Poznámka 9:

Referenční chromatogram pro stigmastadienoly je možné získat analýzou rafinovaných rostlinných olejů s použitím menšího vzorku (1 až 2 g). Stigmastadienoly vytvářejí nápadný a snadno identifikovatelný pík.

6.3.3 Kvantitativní analýza

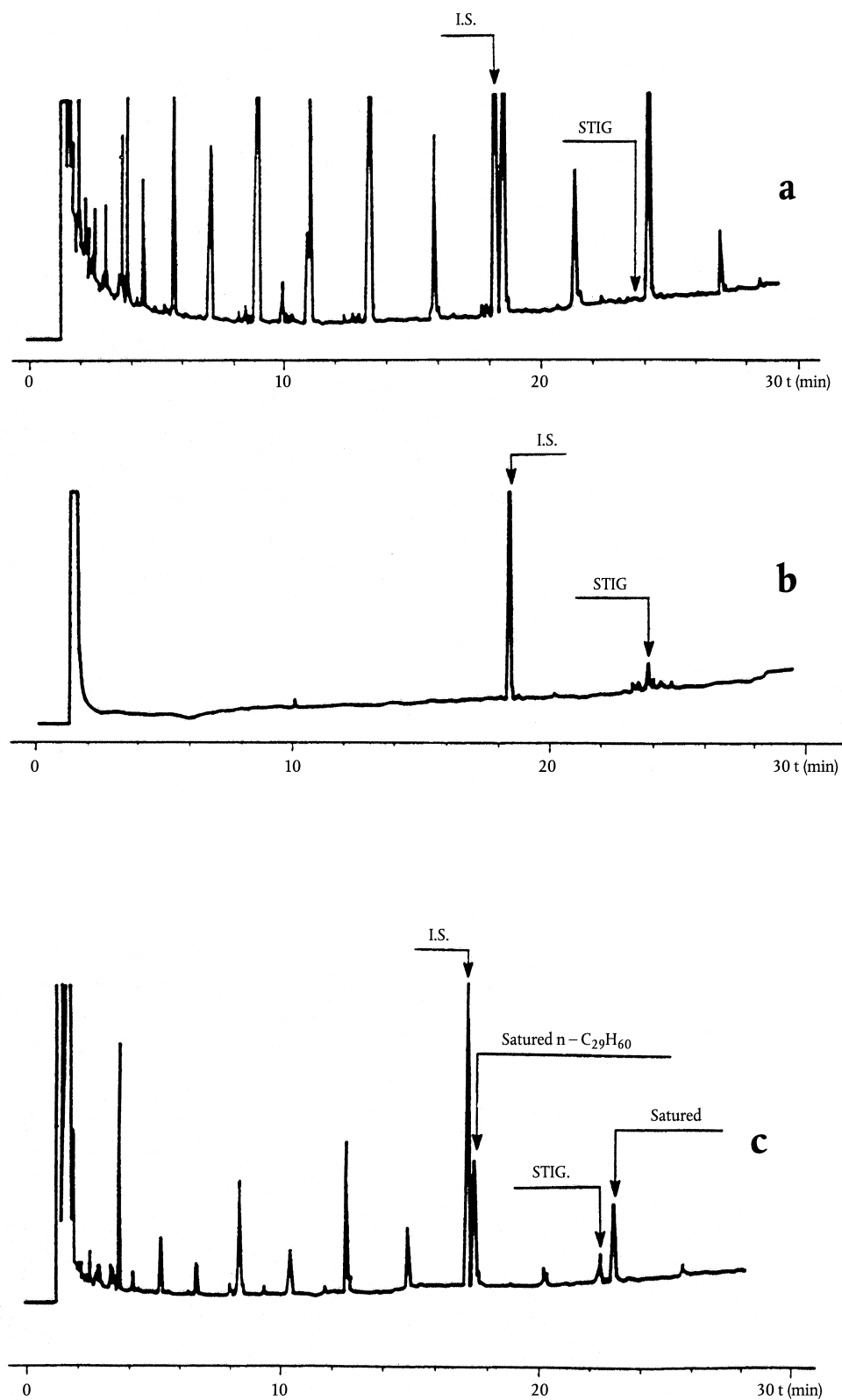
Obsah stigmastadienolů se stanoví podle vzorce:

$$\text{mg/kg stigmastadienolů} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

▼ M11

- kde: A_s = plochy píkù stigmastadienolù (jestliže je pík rozdělen, součet ploch obou izomerù),
 A_c = plochy píkù vnitřního standardu (cholestadienu),
 M_c = hmotnost přidaného standardu v mikrogramech,
 M_o = hmotnost navážených olejů v gramech.

Detekční limit: asi 0,01 mg/kg.

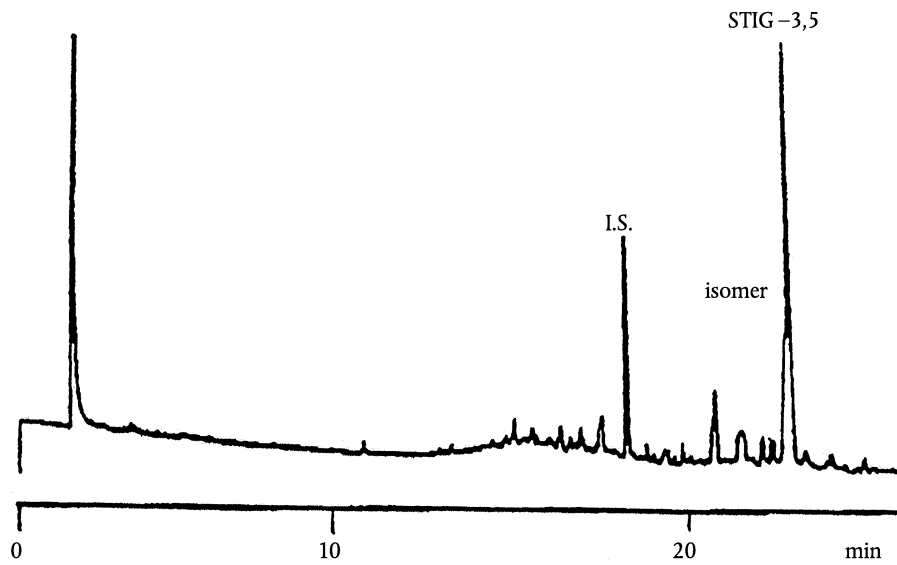
▼ M11

Obrázek č. 1

Plynové chromatogramy vzorků olivového oleje analyzovaných v kapilární koloně z taveného křemene (vnitřní průměr 0,25 mm, délka 25 m) potažené 5 % fenylmethylsilikonem o tloušťce filmu 0,25 μm .

▼ M11

- první frakce (30 ml) z panenského olivového oleje se standardem,
- druhá frakce (40 ml) z olivového oleje obsahujícího 0,10 mg/kg stigmasta-dienolů,
- druhá frakce (40 ml) obsahující malou část první frakce.

**Obrázek č. 2**

Plynový chromatogram získaný ze vzorku rafinovaného olivového oleje analyzovaného na koloně DB-5, vykazující izomer stigmasta-3, 5-dienů.

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

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

2. Field application

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

3. Principle

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

4. Method

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

4.1. Apparatus

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

▼ M13

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

4.1.14. Recorder and/or integrator.

4.2. Reagents

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

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

4.2.2. Ethil ether, peroxides free, freshly distilled.

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

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

4.2.5. Glass wool.

4.2.6. Acetone.

4.2.7. Acetonitrile.

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

4.2.9. Solubilization solvent: acetone.

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

4.3. Sample preparation

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

4.3.1. Chromatographic column preparation

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

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

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

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

▼M13**4.3.2. Column chromatography**

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

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

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

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

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

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

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

4.4.2. Procedure

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

4.4.3. Calculation and expression of results

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

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

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

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

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

▼ M13

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

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

Note 2: Examples: Lichrosorb (Merck) RP 18 Art 50333

Lichrosphere or equivalent (Merck) 100 CH18
Art 50377.

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

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

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

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

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

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

4.5. Calculation of triacylglycerols composition

4.5.1. Determination of fatty acid composition

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

4.5.2. Fatty acids for calculation

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

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

▼M13

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

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

4.5.4. Normalization of fatty acids to 100 %

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

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

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

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

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

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

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

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

▼ **M13**

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

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

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

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

4.5.6. Calculation of triacylglycerols

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

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

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

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

▼ M13

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

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

4.5.6.4. Triacylglycerides with ECN42

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

LLL

PoLL and the positional isomer LPoL

OLLn and the positional isomers OLnL and LnOL

PoPoL and the positional isomer PoLPo

PoOLn and the positional isomers OPoLn and OLnPo

PLLn and the positional isomers LLnP and LnPL

PoPoPo

SLnLn and the positional isomer LnSLn

PPOln and the positional isomers PLnPo and PoPLn

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

5. Evaluation of the results

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

Note: Results are given to within one decimal figure.

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

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

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

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

▼ **M13**

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

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

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

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

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

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

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

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

4.5.4. Normalization of fatty acids to 100 %

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

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

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

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

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

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

$$\text{Total moles \%} = 100,0\%$$

Sum of the saturated and unsaturated fatty acids in the 1,2,3- position of TAGs

$$\text{moles \% SFA} = 10,888\% + 2,944\% = 13,831\% \quad \text{See formula (3)}$$

$$\text{moles \% UFA} = 100,000\% - 13,831\% = 86,169\% \quad \text{See formula (3)}$$

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

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

$$\text{moles \% P(2)} = 10,888\% * 0,06 = 0,653 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (4)}$$

$$\text{moles \% S(2)} = 2,944\% * 0,06 = 0,177 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (4)}$$

▼ **M13**

4.5.5.2. Unsaturated fatty acids in 1,3-position [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) and Ln(1,3)]

$$\text{moles \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 1,263 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (5)}$$

$$\text{moles \% O(2)} = \frac{74,113 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 85,295 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (5)}$$

$$\text{moles \% L(2)} = \frac{9,956 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 11,458 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (5)}$$

$$\text{moles \% Ln(2)} = \frac{1,003 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 1,154 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (5)}$$

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

$$\text{moles \% P(1,3)} = \frac{10,888 - 0,659}{2} 10,888 = 16,005 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

$$\text{moles \% S(1,3)} = \frac{2,944 - 0,177}{2} 2,944 = 4,327 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

$$\text{moles \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,263}{2} 1,097 = 1,015 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

$$\text{moles \% O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,295}{2} 74,113 = 68,522 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

$$\text{moles \% L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} 9,956 = 9,205 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

$$\text{moles \% Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} 1,003 = 0,927 \text{ moles \%} \quad \text{See formula (6)}$$

4.5.6. Calculation of triacylglycerols

From the calculated fatty acid composition in sn-2- and sn-1,3- positions (see above):

FA in	1,3-pos.	2-pos.
P	16,005 %	0,653 %
S	4,327 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,263 %
O	68,522 %	85,295 %
L	9,205 %	11,458 %
Ln	0,927 %	1,154 %
Sum	100,0 %	100,0 %

the following triacylglycerols are calculated:

LLL

PoPoPo

PoLL with 1 positional isomer

SLLn with 1 positional isomer

PoPoL with 1 positional isomer

▼ **M13**

PPoLn with 2 positional isomers

OLLn with 2 positional isomers

PLLn with 2 positional isomers

PoOLn with 2 positional isomers.

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

See formula (7)

$$\text{mol \% LLL} = \frac{9,205 \% * 11,458 \% * 9,205 \%}{10000} = 0,09708 \text{ mol LLL}$$

$$\text{mol \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 1,015 \%}{10000} = 0,00013 \text{ mol PoPoPo}$$

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

See formula (8)

$$\text{mol \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,02141$$

$$\text{mol \% LPoL} = \frac{9,205 \% * 1,263 \% * 9,205 \%}{10000} = 0,01070$$

0,03211 mol PoLL

$$\text{mol \% SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,327 \% * 1,154 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,00093$$

$$\text{mol \% LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10000} = 0,00002$$

0,00095 mol SLnLn

$$\text{mol \% PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,00236$$

$$\text{mol \% PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 1,015 \%}{10000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

4.5.6.3. TAGs with three different fatty acids (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)

See formula (9)

$$\text{mol \% PPoLn} = \frac{16,005 \% * 1,263 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,00375$$

$$\text{mol \% LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10000} = 0,00012$$

$$\text{mol \% PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10000} = 0,00375$$

0,00762 mol PPoLn

▼ **M13**

$$\text{mol \% OLLn} = \frac{68,522 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,14577$$

$$\text{mol \% LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,295 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,14577$$

$$\text{mol \% LLnO} = \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 68,522 \% * 2}{10000} = 0,14577$$

0,43671 mol OLLn

$$\text{mol \% PLLn} = \frac{16,005 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,03400$$

$$\text{mol \% LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,00111$$

$$\text{mol \% LLnP} = \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10000} = 0,03400$$

0,06911 mol PLLn

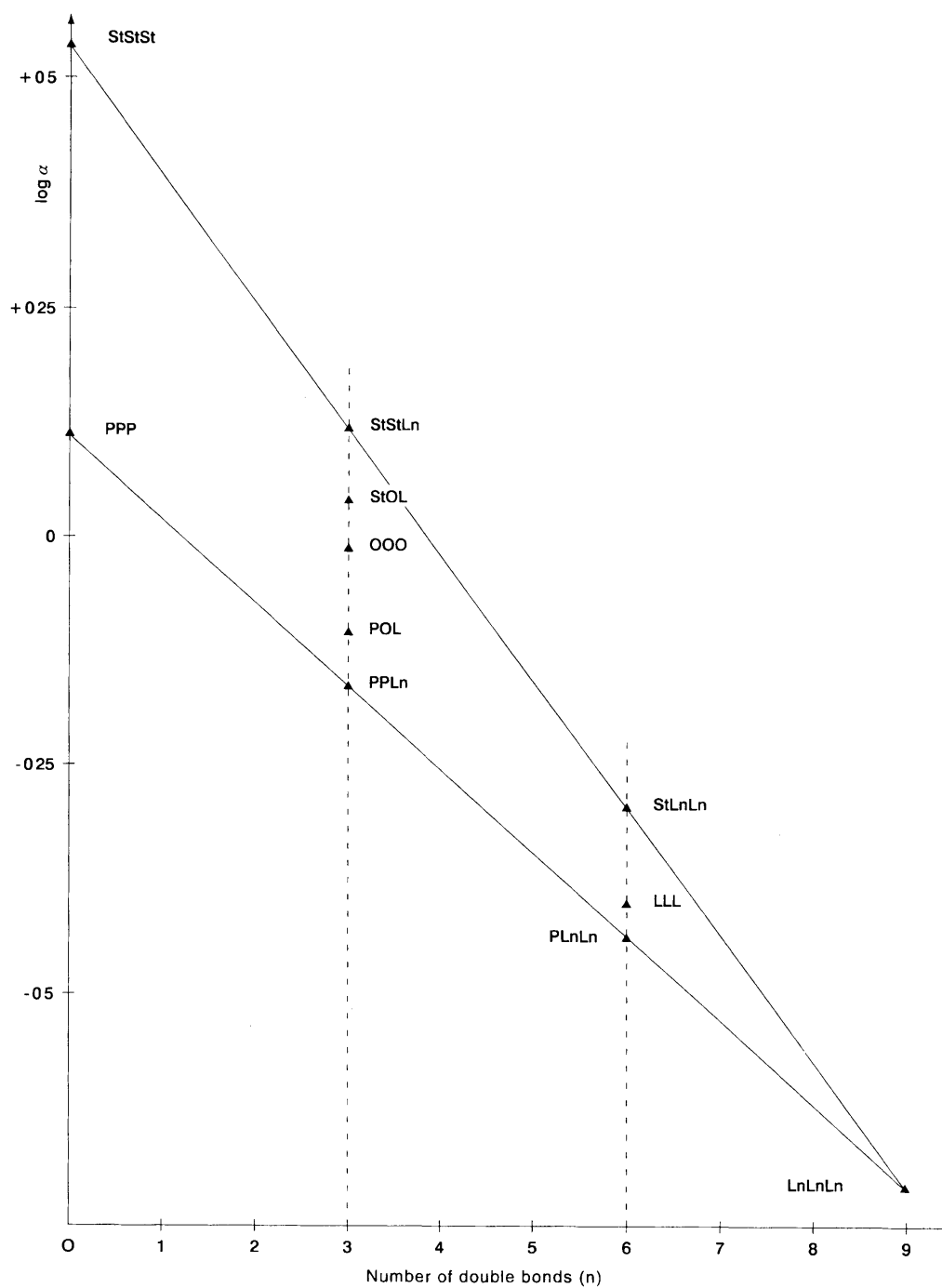
$$\text{mol \% PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,295 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,01605$$

$$\text{mol \% LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,263 \% * 68,522 \% * 2}{10000} = 0,01605$$

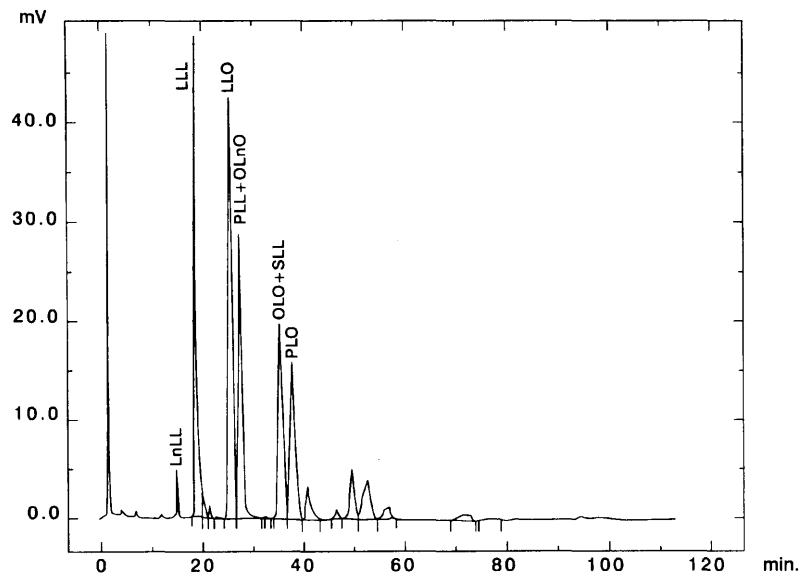
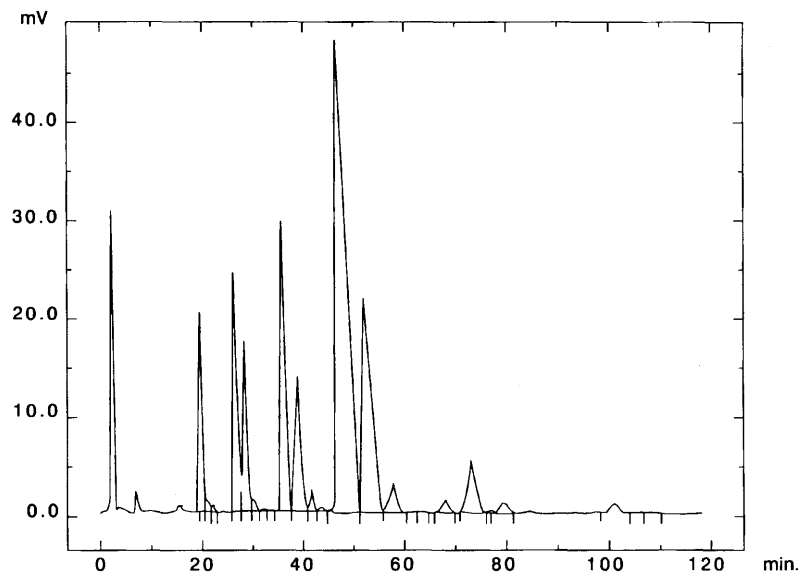
$$\text{mol \% OLnPo} = \frac{68,522 \% * 1,154 \% * 1,015 \% * 2}{10000} = 0,01605$$

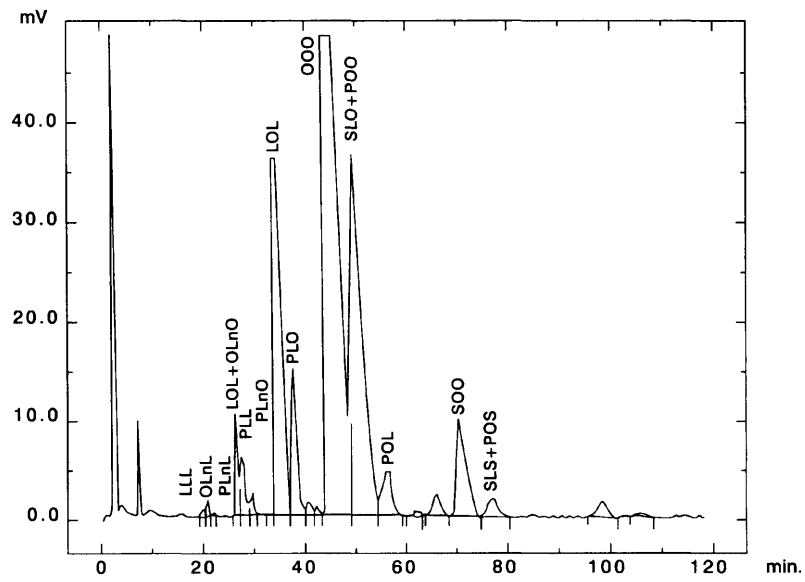
0,04815 mol PoOLn

ECN42 = 0,69540 mol TAGs

▼ **M14****Obrázek 1:** Graf $\log \alpha$ jako funkce f (počet dvojných vazeb)

Poznámka: La = kyselina laurová, L = kyselina linolová, My = kyselina myristová, Ln = kyselina linolenová, P = kyselina palmitová, St = kyselina stearová, O = kyselina olejová.

▼ M14Obrázek 2: *Sójový olej*Obrázek 3: *Sójový olej/olivový olej 30/70*

▼ M14Obrázek 4: *Olivový olej*

▼M19*ANNEX XIX***DETERMINATION OF ALIPHATIC ALCOHOLS CONTENT BY
CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY****1. OBJECT**

The procedure describes a method for the determination of aliphatic alcohols content in oils and fats.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The fatty substance, with 1-eicosanol added as internal standard, is saponified with ethanolic potassium hydroxide and then the unsaponifiable matter extracted with ethyl ether. The alcoholic fraction is separated from the unsaponifiable matter by chromatography on a basic silica gel plate; the alcohols recovered from the silica gel are transformed into trimethylsilyl ethers and analysed by capillary gas chromatography.

3. EQUIPMENT

- 3.1. 250 ml round-bottomed flask fitted with a reflux condenser having ground-glass joints.
- 3.2. 500 ml separating funnel.
- 3.3. 250 ml round-bottomed flasks.
- 3.4. Chromatographic tank for thin-layer chromatographic analysis, for glass plates of dimensions 20 x 20 cm.
- 3.5. Ultraviolet lamp having a wavelength of 366 or 254 nm.
- 3.6. 100 µl and 500 µl microsyringes.
- 3.7. A cylindrical filter funnel with a G3 porous septum (porosity 15 to 40 µm) of diameter approximately 2 cm and a depth of some 5 cm, with an attachment suitable for filtration under vacuum and a 12/21 male ground glass joint.
- 3.8. 50 ml vacuum conical flask with a 12/21 ground-glass female joint which can be fitted to the filter funnel (3.7).
- 3.9. A 10 ml test tube with a tapering bottom and a sealing stopper.
- 3.10. Gas chromatograph for use with a capillary column, and provided with a splitting system composed of:
 - 3.10.1. Thermostatic chamber for columns (column oven) to hold the temperature desired with a precision of ± 1 °C.
 - 3.10.2. A temperature-adjustable injection unit with a persilanised glass vapourising element.
 - 3.10.3. A flame ionisation detector and converter-amplifier.
 - 3.10.4. Recorder-integrator for operation with the converter-amplifier (3.10.3), with response time not exceeding one second and with variable paper-speed.
- 3.11. Glass or fused silica capillary column, of length 20 to 30 m, internal diameter 0,25 to 0,32 mm, with SE-52 or SE-54 liquid phase or equivalent, with a film thickness between 0,10 and 0,30 µm.
- 3.12. Microsyringe for gas chromatography, of 10 µl capacity with hardened needle.
- 3.13. Analytical balance sensitive to 1 mg (with 0,1 mg display).

▼ M19

4. REAGENTS

- 4.1. Potassium hydroxide, approximately 2 N ethanolic solution: 130 g potassium hydroxide (minimum concentration 85 %) is dissolved, with cooling, in 200 ml distilled water and then made up to one litre with ethanol. The solution should be stored in a well-stoppered opaque glass bottle.
- 4.2. Ethyl ether, pure for analysis.
- 4.3. Anhydrous sodium sulphate, analytical purity.
- 4.4. Glass plates coated with silica gel, without fluorescence indicator, thickness 0,25 mm (commercially available ready for use).
- 4.5. Potassium hydroxide, approximately 0,2 N ethanolic solution; 13 g of potassium hydroxide are dissolved in 20 ml of distilled water and made up to one litre with ethanol.
- 4.6. Benzene, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.7. Acetone, for chromatography (See 5.2.2).
- 4.8. Hexane, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.9. Ethyl ether, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.10. Chloroform, for chromatography.
- 4.11. Reference solution for thin-layer chromatography: cholesterol or phytosterols, 5 % solution in chloroform.
- 4.12. 0,2 % solution of 2', 7'-dichlorofluorescein in ethanol. Make slightly basic by adding a few drops of 2 N alcoholic potassium hydroxide solution.
- 4.13. Anhydrous pyridine, for chromatography.
- 4.14. Hexamethyl disilazane.
- 4.15. Trimethylchlorosilane.
- 4.16. Standard solutions of trimethylsilyl ethers of aliphatic alcohols from C₂₀ to C₂₈. They may be prepared from mixtures of pure alcohols at the time they are required for use.
- 4.17. A 0,1 % (m/v) solution of 1-eicosanol in chloroform (internal standard).
- 4.18. Carrier gas: hydrogen or helium, gas-chromatographic purity.
- 4.19. Auxiliary gas: nitrogen, gas-chromatographic purity.

5. PROCEDURE

5.1. **Preparation of the unsaponifiables**

- 5.1.1. Using a 500 µl microsyringe place, into a 250 ml round-bottom flask, a volume of 0,1 % 1-eicosanol solution in chloroform (4.17) containing a quantity of 1-eicosanol approximately equal to 10 % of the aliphatic alcohols content in that portion of sample to be taken for analysis. For example, to 5 g of sample add 250 µl of the 0,1 % 1-eicosanol solution if olive oil and 1 500 µl if olive pomace oil.

Evaporate to dryness in current of nitrogen and then weigh accurately 5 g of the dry filtered sample into the same flask.

▼ **M19**

5.1.2. Add 50 ml of 2 N potassium hydroxide ethanolic solution, fit the reflux condenser and heat the apparatus to slight boiling on a steam bath, stirring continuously throughout the heating process until saponification has taken place (the solution becomes clear). Continue heating for a further 20 minutes and then add 50 ml of distilled water through the condenser. The condenser is then disconnected and the flask cooled to approximately 30 °C.

5.1.3. The contents of the flask are quantitatively transferred to a separating funnel of 500 ml capacity by adding distilled water several times, using a total of around 50 ml distilled water. Add approximately 80 ml of ethyl ether, shake vigorously for approximately 30 seconds and allow to settle (Note 1).

Separate off the lower aqueous phase collecting it in a second separating funnel. Two further extractions are effected on the aqueous phase, in the same manner, using each time 60 to 70 ml ethyl ether.

Note 1: Emulsions may be eliminated by adding, using as a spray, small quantities of ethyl alcohol or methyl alcohol.

5.1.4. The ethyl ether extracts are combined in a separating funnel and washed with distilled water (50 ml at a time) until the washing water gives a neutral reaction.

Discard the washing water, dry with anhydrous sodium sulphate and filter, into a flask of 250 ml capacity which has been weighed beforehand, the funnel and filter being washed with small quantities of ethyl ether which are added to the total.

5.1.5. Distil the ether down to a few ml, then bring to dryness under a slight vacuum or in a current of nitrogen, completing drying in an oven at 100 °C for approximately a quarter of an hour, and then weigh after cooling in a desiccator.

5.2. Separation of alcoholic fractions

5.2.1. Preparation of basic TLC plates: the silica gel plates (4.4) are immersed completely, in 0,2 N potassium hydroxide solution (4.5) for 10 seconds, and then left to dry for two hours under an extractor hood and finally placed in an oven at 100 °C for one hour.

Remove from the oven and keep in a calcium chloride desiccator until required for use (plates treated in this way must be used within 15 days).

Note 2: When basic silica gel plates are used to separate the alcoholic fraction there is no need to treat the unsaponifiables with alumina. It follows that all acid compounds (fatty acids and others) are retained at the origin thereby obtaining both aliphatic alcohol and terpenic alcohol bands which are both separated distinctly from the sterol band.

5.2.2. Place a 65/35 by volume hexane/ethyl ether mixture in the plate-developing chamber to a depth of approximately 1 cm ⁽¹⁾.

Close the chamber using an appropriate cover and leave for half an hour to allow equilibration between vapour and liquid. Strips of filter paper dipping into the eluent may be affixed to the inside surfaces of the tank to reduce the development time by approximately one third and obtain more uniform, regular elution of the components.

⁽¹⁾ In these cases in particular, a 95/5 by volume benzene/acetone eluent mixture must be used to obtain distinct band separation.

▼ M19

Note 3: The developing solution must be replaced for each analysis in order to obtain reproducible developing conditions.

- 5.2.3. An approximately 5 % solution of unsaponifiable matter (5.1.5) in chloroform is prepared and 0,3 ml of the solution is streaked as a uniform strip of minimum thickness, using the 100 µl microsyringe, on a TLC plate at approximately 2 cm from the bottom of the TLC plate. Aligned with the origin, 2 to 3 µl of the aliphatic alcohols reference solution (4.11) are spotted for the identification of the aliphatic alcohols band after development has been completed.
- 5.2.4. Place the plate inside the development tank as stated in 5.2.2. The ambient temperature should be maintained between 15 and 20 °C. Immediately close the chamber with the cover and allow to elute until the solvent front reaches approximately 1 cm from the upper edge of the plate.

The plate is then removed from the development chamber and the solvent evaporated under a hot air current or the plate is left for a while under the extractor hood.

- 5.2.5. The plate is sprayed lightly and evenly with the solution of 2', 7'-dichlorofluorescein when the plate is observed under ultra violet light. The aliphatic alcohols band can be identified through being aligned with the stain obtained from the reference solution: mark the limits of the band with a black pencil; outlining the band of aliphatic alcohols and the band immediately above that, which is the terpenic alcohols band, together.

Note 4: The aliphatic alcohols band and the terpenic alcohols band are to be grouped together in view of the possible migration of some aliphatic alcohols into the triterpenic alcohols band.

- 5.2.6. Using a metal spatula scrape off the silica gel in the marked area. Place the finely comminuted material removed into the filter funnel (3.7). Add 10 ml of hot chloroform, mix carefully with the metal spatula and filter under vacuum, collecting the filtrate in the conical flask (3.8) attached to the filter funnel.

Wash the pomace in the flask three times with ethyl ether (approximately 10 ml each time) collecting the filtrate in the same flask attached to the funnel. Evaporate the filtrate to a volume of 4 to 5 ml, transfer the residual solution to the previously weighed 10 ml test tube (3.9), evaporate to dryness by mild heating in a gentle flow of nitrogen, make up again using a few drops of acetone, evaporate again to dryness, place in an oven at 105 °C for approximately 10 minutes and then allow to cool in a desiccator and weigh.

The pomace inside the test tube is composed of the alcoholic fraction.

5.3. Preparation of the trimethylsilyl ethers

- 5.3.1. The reagent for silylation, consisting of a mixture of 9:3:1 by volume (Note 5) of pyridine-hexamethyldisilazane-trimethylchlorosilane in the proportion of 50 µl for each milligram of aliphatic alcohols, is added to the test tube containing the alcoholic fraction, avoiding all absorption of moisture (Note 6).

▼ M19

Note 5: Solutions which are ready for use are available commercially. Other silanising reagents such as, for example, bis-trimethylsilyl, trifluor acetamide + 1 % trimethyl chlorosilane, which has to be diluted with an equal volume of anhydrous pyridine, are also available.

Note 6: The slight opalescence which may form is normal and does not cause any interference. The formation of a white floc or the appearance of a pink colour are indicative of the presence of moisture or deterioration of the reagent. If these occur the test must be repeated.

5.3.2. Stopper the test tube, shake carefully (without overturning) until the aliphatic alcohols are completely dissolved. Stand for at least 15 minutes at ambient temperature and then centrifuge for a few minutes. The clear solution is ready for gas chromatographic analysis.

5.4. Gas chromatography analysis**5.4.1. Preliminary operations, column packing**

5.4.1.1. Fit the column in the gas chromatograph, attaching the inlet end to the injector connected to the splitting system and the outlet end to the detector. Carry out a general check of the gas chromatography assembly (tightness of gas fittings, efficiency of the detector, efficiency of the splitting system and of the recording system, etc.).

5.4.1.2. If the column is being used for the first time it is recommended that it should be subjected to conditioning. A little carrier gas is passed through the capillary column and then the gas chromatography assembly is switched on and gradually heated until a temperature not less than 20 °C above the operating temperature (see Note 7) is attained. That temperature is held for not less than two hours and then the assembly is brought to the operating conditions (regulation of gas flow, split flame ignition, connection to the electronic recorder, adjustment of the temperature of the capillary column oven, the detector and the injector, etc.) and the signal is adjusted to a sensitivity not less than twice the highest level contemplated for the execution of the analysis. The course of the base line must be linear, without peaks of any kind, and must not drift. A negative straight-line drift indicates leakage from the column connections; a positive drift indicates inadequate conditioning of the column.

Note 7: The conditioning temperature shall be at least 20 °C less than the maximum temperature contemplated for the liquid phase employed.

5.4.2. Choice of operating conditions

5.4.2.1. The guideline operating conditions are as follows:

— column temperature: the initial isotherm is set at 180 °C for eight minutes and then programmed at 5 °C/minute to 260 °C and a further 15 minutes at 260 °C,

— temperature of evaporator: 280 °C,

— temperature of detector: 290 °C,

— linear velocity of carrier gas: helium 20 to 35 cm/s, hydrogen 30 to 50 cm/s,

— splitting ratio: 1:50 to 1:100,

— sensitivity of instrument: 4 to 16 times the minimum attenuation,

▼ M19

- sensitivity of recording: 1 to 2 mV fs,
- paper speed: 30 to 60 cm/h,
- quantity of substance injected: 0,5 to 1 µl of TMSE solution.

The above conditions may be modified according to the characteristics of the column and of the gas chromatograph to obtain chromatograms satisfying the following conditions:

- alcohol C₂₆ retention time shall be 18 ± 5 minutes,
- the alcohol C₂₂ peak shall be 80 ± 20 % of the full scale value for olive oil and 40 ± 20 % of the full scale value for seed oil.

5.4.2.2. The above requirements are checked by repeated injection of the standard TMSE mixture of alcohols and the operating conditions are adjusted to yield the best possible results.

5.4.2.3. The parameters for the integration of peaks shall be set so that a correct appraisal of the areas of the peaks considered is obtained.

5.4.3. Analytical procedure

5.4.3.1. Using the microsyringe of 10 µl capacity draw in 1 µl of hexane followed by 0,5 µl of air and subsequently 0,5 to 1 µl of the sample solution; raise the plunger of the syringe further so the needle is emptied. Push the needle through the membrane of the injection unit and after one to two seconds inject rapidly, then slowly remove the needle after some five seconds.

5.4.3.2. Recording is effected until the TMSE of the aliphatic alcohols present have been eluted completely. The base line shall always correspond to the requirements of 5.4.1.2.

5.4.4. Peak identification

The identification of individual peaks is effected according to the retention times and by comparison with the standard TMSE mixture, analysed under the same conditions.

A chromatogram of the alcoholic fraction of a virgin olive oil is shown in Figure 1.

5.4.5. Quantitative evaluation

5.4.5.1. The peak areas of 1-eicosanol and of the aliphatic alcohols C₂₂, C₂₄, C₂₆ and C₂₈ are calculated by electronic integration.

5.4.5.2. The contents of each aliphatic alcohol, expressed in mg/1 000 g fatty substance, are calculated as follows:

$$\text{alcohol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

where:

A_x = area of the alcohol peak x

A_s = area of 1-eicosanol

m_s = mass of 1-eicosanol in milligrams

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

6. EXPRESSION OF THE RESULTS

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

▼ M19

APPENDIX

Determination of the linear velocity of the gas

1 to 3 μl of methane or propane are injected into the gas chromatograph set at normal operating conditions and the time taken for the methane or propane to flow through the column from the instant of injection to the instant the peak elutes (t_M) is measured using a stop clock.

The linear velocity in cm/s is given by L/t_M , where L is the length of the column in centimetres and t_M is the measured time in seconds.

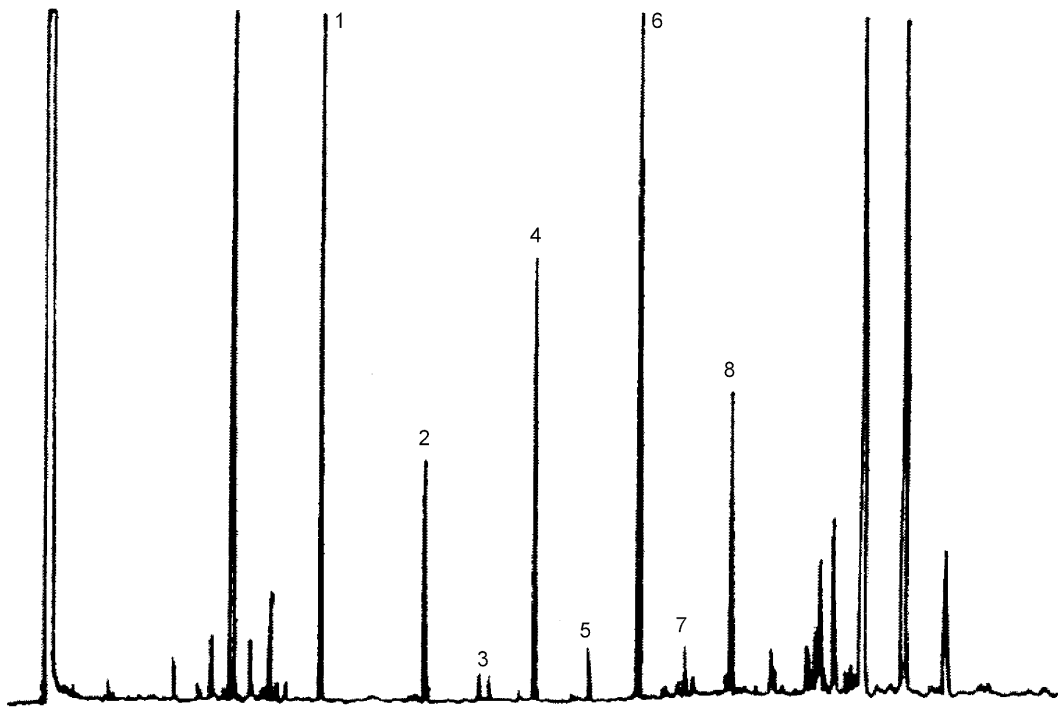


Figure 1 — Chromatogram of the alcoholic fraction of virgin oil

- 1 = Eicosanol
- 2 = Decosanol
- 3 = Tricosanol
- 4 = Tetracosanol
- 5 = Pentacosanol
- 6 = Hexacosanol
- 7 = Heptacosanol
- 8 = Octacosanol

▼ **M23***PŘÍLOHA XX***Metoda stanovení obsahu vosků, methylesterů mastných kyselin a ethylesterů mastných kyselin kapilární plynovou chromatografií**

1. ÚČEL

Tato metoda slouží ke stanovení obsahu vosků, methylesterů mastných kyselin a ethylesterů mastných kyselin v olivových olejích. Jednotlivé vosky a alkylestery jsou separovány podle počtu atomů uhlíku. Metoda je doporučeným nástrojem pro rozlišení mezi olivovým olejem a olivovým olejem z pokrutin a stanoví jakostní parametr pro extra panenský olivový olej, což umožňuje rozeznat podvodně smíchané extra panenské olivové oleje s oleji nižší kvality, ať už se jedná o panenské, lampantové či jiné dezodorizované oleje.

2. PODSTATA METODY

K oleji se přimísí vhodný vnitřní standard a poté se provádí chromatografická frakční destilace na hydratované silikagelové koloně. Získaná frakce eluovaná při testovacích podmínkách (jejíž polarita je menší než polarita triglyceridů) se přímo analyzuje pomocí kapilární plynové chromatografie.

3. ZAŘÍZENÍ

3.1. **Kónická 25ml baňka.**

3.2. **Skleněná kolona** pro kapalnou chromatografii o vnitřním průměru 15 mm a délce 30 až 40 cm vybavená vhodným kohoutem.

3.3. **Plynový chromatograf**, vhodný pro použití s kapilární kolonou a vybavený systémem pro přímý nástřik na kolonu, obsahující následující části:

3.3.1. **termostaticky ovládatelná kolonová komora s nastavitelnou teplotou;**

3.3.2. **studené nástřikové zařízení** pro přímé zavádění do kolony;

3.3.3. **plameno-ionizační detektor a konverzní zesilovač;**

3.3.4. **integrátor se zapisovačem** (poznámka 1), vhodný pro provoz s konverzním zesilovačem (bod 3.3.3), s rychlostí odezvy nižší než 1 sekunda a s nastavitelnou rychlostí posunu papíru;

Poznámka 1: Jsou-li data plynové chromatografie zadávána do počítače, lze také použít počítačem řízené systémy.

3.3.5. **kapilární kolona z taveného křemene (pro analýzu vosků, methylesterů a ethylesterů)**, dlouhá 8 až 12 m s vnitřním průměrem 0,25 až 0,32 mm, obsahující kapalnou fázi (poznámka 2), o jednotné tloušťce 0,10 až 0,30 μm ;

Poznámka 2: Pro tento účel jsou k dispozici vhodné komerční kapalně fáze, např. SE52, SE54 atd.

3.4. **mikrostřikačka** na 10 μl pro přímý vstřik do kolony opatřená tvrzenou jehlou;

3.5. **elektrický vibrátor;**

3.6. **rotační odparka;**

3.7. **muflová pec;**

3.8. **analytická váha** pro vážení s přesností $\pm 0,1$ mg;

▼ **M23**

3.9. běžné laboratorní sklo.

4. ČINIDLA

4.1. **Silikagel**, 60–200 µm mesh. Silikagel se umístí alespoň na čtyři hodiny do muflové pece o teplotě 500 °C. Nechá se ochladit a přidají se 2 % vody v závislosti na množství použitého silikagelu. Řádným protřepáním se směs homogenizuje a před použitím se ponechá nejméně 12 hodin v exsikátoru.

4.2. **N-hexan** čistoty pro chromatografii nebo pro residuální analýzu (čistota musí být kontrolována).

POZOR! - Výpary se mohou vznítit. Chraňte před zdroji tepla, jiskrami či přímým plamenem. Ujistěte se, že jsou láhve vždy řádně uzavřeny. Při použití zajistěte řádné větrání. Zabraňte hromadění výparů a eliminujte veškeré příčiny možného vzniku požáru, jako jsou topná tělesa a elektrická zařízení, jež nejsou vyrobeny z nehořlavého materiálu. Vdechnutí je škodlivé, neboť může dojít k poškození nervových buněk. Zabraňte vdechnutí výparů. V případě nutnosti použijte vhodný respirační přístroj. Zabraňte styku s očima a s pokožkou.

4.3. **Ethylether pro chromatografii**

POZOR! - Vysoce hořlavý a mírně jedovatý. Dráždí pokožku. Vdechnutí je škodlivé. Může způsobit poškození zraku. Účinky mohou být opožděné. Může vytvářet výbušné peroxidy. Výpary se mohou vznítit. Chraňte před zdroji tepla, jiskrami či přímým plamenem. Ujistěte se, že jsou láhve vždy řádně uzavřeny. Při použití zajistěte řádné větrání. Zabraňte hromadění výparů a eliminujte veškeré příčiny možného vzniku požáru, jako jsou topná tělesa a elektrická zařízení, jež nejsou vyrobeny z nehořlavého materiálu. Neodpařujte do sucha nebo téměř do sucha. Přidání vody nebo vhodného redukčního prvku může omezit tvorbu peroxidů. Nepijte. Zabraňte vdechnutí výparů. Zabraňte dlouhotrvajícímu či opakovanému styku s pokožkou.

4.4. **N-heptan** čistoty pro chromatografii nebo **isooktan**.

POZOR! - Hořlavý. Vdechnutí je škodlivé. Chraňte před zdroji tepla, jiskrami či přímým plamenem. Ujistěte se, že jsou láhve vždy řádně uzavřeny. Při použití zajistěte řádné větrání. Zabraňte vdechnutí výparů. Zabraňte dlouhotrvajícímu či opakovanému styku s pokožkou.

4.5. **Standardní roztok 0,05 % (m/V) laurylcharidátu** (*poznámka 3*) v heptanu (vnitřní standard pro vosky).

Poznámka 3: Lze také použít palmityl-palmitát, myristyl-stearát či arachidyl-laureát.

4.6. **Standardní roztok 0,02 % (m/V) methylheptakaprinátu v heptanu** (vnitřní standard pro methylestery a ethylestery).

4.7. **Sudan 1 (1-fenylazo-2-naftol)**.

▼ **M23****4.8. Nosný plyn: vodík či helium, čistý pro plynovou chromatografii.****POZOR!**

Vodík. Pod tlakem vysoce hořlavý. Chraňte před zdroji tepla, jiskrami, přímým plamenem a uchovávejte mimo dosah elektrických přístrojů z hořlavého materiálu. Ujistěte se, zda je ventil láhve po použití vodíku vždy uzavřen. Používejte vždy s redukčním ventilem. Před otevřením ventilu láhve uvolněte pnutí pružiny redukčního ventilu. Při otvírání ventilu nestůjte před výpustným otvorem láhve. Při použití zajistěte řádné větrání. Nepřepouštějte vodík z jedné láhve do druhé. Nemíchejte plyn v láhvi. Ujistěte se, že láhve nelze převrhnout. Chraňte je před slunečním světlem a před zdroji tepla. Skladujte v nekorozivním prostředí. Nepoužívejte poškozené nebo neoznačené láhve.

Helium. Vysoce stlačený plyn. Snižuje množství kyslíku pro dýchání. Uchovávejte v zavřené láhvi. Při použití zajistěte řádné větrání. Nevstupujte do skladovacích prostor, pokud nejsou řádně větrány. Používejte vždy s redukčním ventilem. Před otevřením ventilu láhve uvolněte pnutí pružiny redukčního ventilu. Nepřepouštějte plyn z jedné láhve do druhé. Ujistěte se, že láhve nelze převrhnout. Při otvírání ventilu nestůjte před výpustným otvorem láhve. Chraňte je před slunečním světlem a před zdroji tepla. Skladujte v nekorozivním prostředí. Nepoužívejte poškozené nebo neoznačené láhve. Nevdechujte. Používejte výhradně pro technické účely.

4.9. Pomocné plyny:

— Vodík, čistý pro plynovou chromatografii.

— Vzduch, čistý pro plynovou chromatografii.

POZOR!

Vzduch. Vysoce stlačený plyn. Dbejte opatrnosti při použití v přítomnosti hořlavých látek, protože teplota pro samovznícení většiny organických složek vzduchu je při vysokém tlaku znatelně nižší. Ujistěte se, že je ventil láhve po použití vždy uzavřen. Vždy používejte redukční ventil. Před otevřením ventilu láhve uvolněte pnutí pružiny redukčního ventilu. Při otvírání ventilu nestůjte před výpustným otvorem láhve. Nepřepouštějte plyn z jedné láhve do druhé. Nemíchejte plyn v láhvi. Ujistěte se, že láhve nelze převrhnout. Chraňte je před slunečním světlem a před zdroji tepla. Skladujte v nekorozivním prostředí. Nepoužívejte poškozené nebo neoznačené láhve. Vzduch pro technické účely nesmí být vdechován nebo používán v respiračních přístrojích.

5. POSTUP**5.1. Příprava chromatografické kolony**

15 g silikagelu (bod 4.1) se suspenduje v n-hexanu (bod 4.2) a zavede do kolony (bod 3.2). Po spontánní sedimentaci se tato dokončí pomocí elektrického vibrátoru, aby byla chromatografická vrstva co nejhomogennější. Proveďte se perkolace 30 ml n-hexanu za účelem odstranění případných nečistot. Do 25ml baňky (bod 3.1) se na analytické váze (bod 3.8) naváží přesně 500 mg vzorku a přidá se vhodné množství vnitřního standardu (bod 4.5) v závislosti na předpokládaném obsahu vosku, např. 0,1 mg laurylcharidátu v případě olivového oleje, 0,25 až 0,5 mg v případě olivového oleje z pokrutin a 0,05 mg methylheptakaprinátu v případě olivových olejů (bod 4.6).

▼ **M23**

Získaný vzorek se za pomoci dvou dávek 2 ml n-hexanu (bod 4.2) převede do chromatografické kolony.

Umožní se, aby hladina rozpouštědla poklesla tak, aby byla 1 mm nad horní úroveň absorbentu. Perkoluje se další n-hexan/diethyleter (99:1) a odebere se 220 ml při průtoku přibližně 15 kapek za 10 sekund. **(Tato frakce obsahuje methylestery, ethylestery a vosky.)** (poznámka 4) (poznámka 5)

Poznámka 4: Každý den by se měla připravit čerstvá směs n-hexanu/diethyleteru (99:1).

Poznámka 5: Do vzorku roztoku lze přidat 100 µl eluční směsi s 1 % barviva Sudan I pro účely vizuální kontroly řádné eluce vosků.

Retenční doba barviva je mezi retenční dobou vosků a triglycerolů. Když tedy barvivo dosáhne dna chromatografické kolony, musí být eluce suspendována, protože veškeré vosky byly eluovány.

Získaná frakce se usuší v rotačním odpařovači, až je téměř všechno rozpouštědlo odstraněno. Poslední 2 ml rozpouštědla se odstraní za pomoci slabého proudu dusíku. Odebere se frakce obsahující methylestery a ethylestery tak, že se naředí 2 až 4 ml n-heptanu nebo isoooktanu.

5.2. Plynová chromatografická analýza

5.2.1. Přípravné práce

Kolona se spojí s plynovým chromatografem (bod 3.3), vstupní port se připojí ke kolonovému systému (on-column system) a výstupní port k detektoru. Poté se plynový chromatograf překontroluje (těsnost plynových vedení, funkce detektoru a záznamníku atd.).

Kolonu, která má být použita poprvé, je nutno nejprve kondicionovat. Kolonou se nechá protékat malé množství nosného plynu, poté se zapne plynový chromatograf. Nechá se postupně zahřívát, dokud není po přibližně čtyřech hodinách dosaženo teploty 350 °C.

Tato teplota se udržuje nejméně dvě hodiny a poté se systém převede do předepsaných podmínek (regulace průtoku plynu, zapálení plamene, připojení elektronického zapisovače (bod 3.3.4), nastavení teploty kolonové komory, detektoru, atd.). Signál se nastaví na citlivost, která činí nejméně dvojnásobek nejvyšší úrovně uvažované pro provedení analýzy. Základní linie záznamu musí být rovná, bez jakýchkoli píků nebo driftů.

Záporné driftы jsou známkou nedokonalé těsnosti spojů kolony, zatímco kladné svědčí o nedostatečné kondicionaci kolony.

5.2.2. Výběr pracovních podmínek pro vosky, methylestery a ethylestery (poznámka 6).

Všeobecné pracovní podmínky jsou tyto:

— Teplota kolony:

20 °C/min 5 °C/min

počáteční teplota 80 °C (1') ————— 140 °C —————
335 °C (20)

— Teplota detektoru: 350 °C.

— Množství nastříknuté látky: 1 µl roztoku n-heptanu (2 až 4 ml).

▼ M23

- Nosný plyn: helium nebo vodík při optimální lineární rychlosti pro zvolený plyn (viz dodatek A).
- Citlivost přístroje: vhodná pro dosažení výše uvedených podmínek.

Poznámka 6: Z důvodu vysoké konečné teploty je povolen kladný drift, nesmí však přesáhnout 10 % plného rozsahu.

Tyto podmínky mohou být upraveny podle charakteristik kolony a plynového chromatografu s cílem oddělit veškeré vosky, methylestery mastných kyselin a ethylestery mastných kyselin a dosáhnout přijatelné separace píků (viz obrázky 2, 3 a 4) a retenčního času vnitřního standardu laurylcharidátu 18 ± 3 minuty. Nejreprezentativnější pík vosků musí dosáhnout 60 % z plného rozsahu, vnitřní standard methylheptakaprinát pro methylestery a ethylestery musí dosáhnout plného rozsahu.

Parametry pro integraci píků se nastaví tak, aby došlo ke správnému vyhodnocení ploch uvažovaných píků.

5.3. Provedení analýzy

Do 10 μ l mikrostřikačky se natáhne 10 μ l roztoku; píst mikrostřikačky se povytáhne tak, aby se vyprázdnila jehla. Jehla se zavede do vstříkové komory a po jedné nebo dvou sekundách se rychle nastříkne roztok. Přibližně po pěti sekundách se jehla pomalu vytáhne.

Zaznamenávání je prováděno, dokud vosky nebo stigmastadieny nejsou zcela eluovány v závislosti na analyzované frakci.

Základní linie záznamu musí vždy odpovídat požadovaným podmínkám.

5.4. Identifikace píků

Identifikace jednotlivých píků se provádí podle retenčních časů a porovnáním se směsmi vosků, jejichž retenční časy jsou známy a které byly analyzovány za stejných podmínek. Alkylestery se identifikují ze směsí methylesterů a ethylesterů hlavních mastných kyselin v olivových olejích (palmitová a olejová).

Chromatogram vosků panenského olivového oleje je znázorněn na obrázku 1. Obrázky 2 a 3 zobrazují chromatogramy dvou maloobchodně prodávaných extra panenských olivových olejů, jeden obsahuje methylestery a ethylestery, v druhém obsaženy nejsou. Na obrázku 4 jsou chromatogramy extra panenského olivového oleje nejvyšší třídy a stejného oleje uměle obohaceného 20 % dezodorizovaného oleje.

5.5. Kvantitativní vyhodnocení vosků

Pomocí integrátoru se vypočítají plochy píků odpovídajících vnitřnímu standardu laurylcharidátu a alifatickým esterům C_{40} až C_{46} .

Celkový obsah vosků se vypočítá sečtením jednotlivých vosků v mg/kg tukové látky takto:

$$\text{Vosky, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ M23

kde:

A_x = plocha píku příslušného esteru vypočtená počítačem

A_s = plocha píku vnitřního standardu laurylcharidátu vypočtená počítačem

m_s = hmotnost přidaného vnitřního standardu laurylcharidátu v mg;

m = hmotnost vzorku použitého pro stanovení v gramech.

5.5.1. Kvantitativní vyhodnocení methylesterů a ethylesterů

Pomocí integrátoru se vypočítají plochy píků odpovídajících vnitřnímu standardu methylheptakaprinátu, methylesterů mastných kyselin C_{16} a C_{18} a ethylesterů mastných kyselin C_{16} a C_{18} .

Obsah každého alkylesteru v mg/kg tukové látky se vypočítá takto:

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

kde:

A_x = plocha píku příslušného esteru C_{16} a C_{18} vypočtená počítačem

A_s = plocha píku vnitřního standardu methylheptakaprinátu vypočtená počítačem

m_s = hmotnost přidaného vnitřního standardu methylheptakaprinátu v mg;

m = hmotnost vzorku použitého pro stanovení v gramech.

6. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

Uvádí se souhrn obsahů jednotlivých vosků C_{40} až C_{46} (*poznámka 7*) v mg/kg tukové látky.

Uvádí se souhrn obsahů jednotlivých methylesterů a ethylesterů C_{16} až C_{18} a celkový součet methylesterů a ethylesterů.

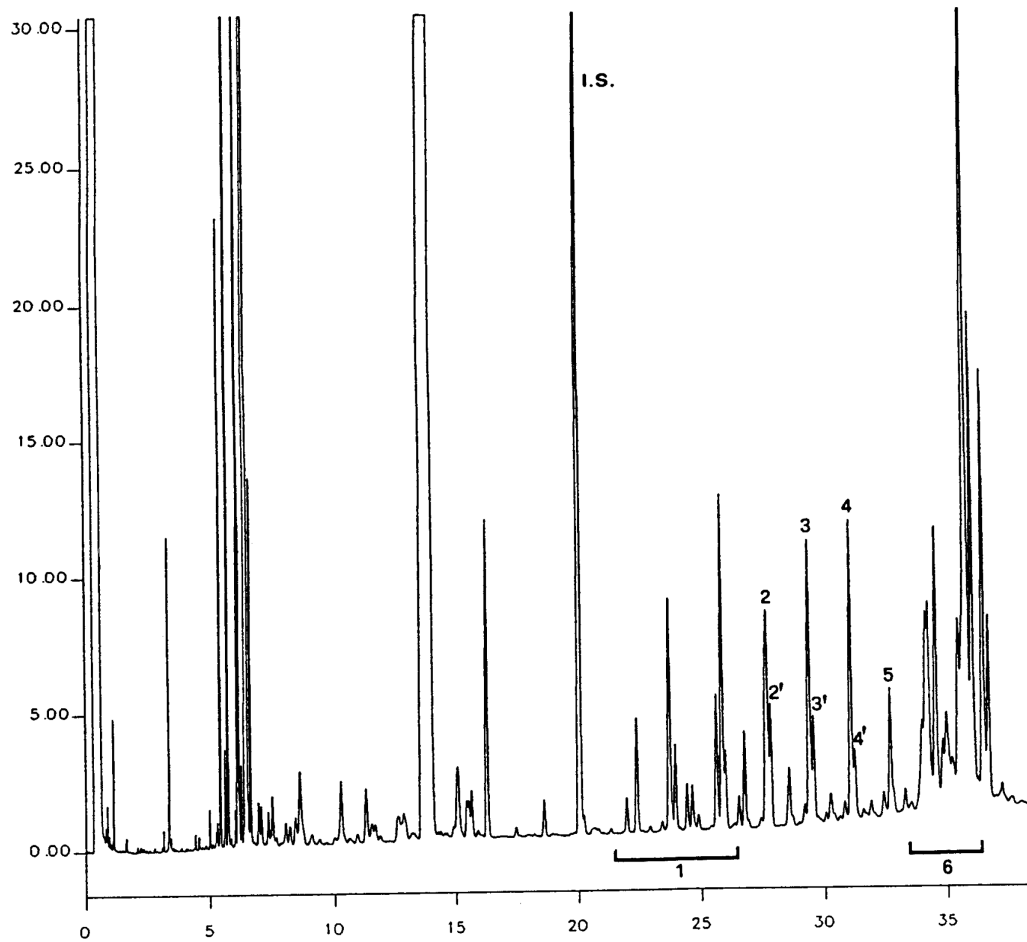
Výsledky se zaokrouhlují na celé mg/kg.

Poznámka 7: Prvky kvantitativního vyhodnocení se vztahují k píkům esterů se sudým karbonovým číslem C_{40} až C_{46} podle vzorového chromatogramu vosků v olivovém oleji na přiloženém obrázku. Pokud se ester C_{46} rozštěpí, doporučuje se pro účely identifikace analyzovat frakci vosku olivového oleje z pokrutin, kde lze pik C_{46} rozlišit, neboť zřetelně převládá.

Uvádí se poměr mezi ethylestery a methylestery.

▼ M23

Obrázek 1

Příklad plynového chromatogramu frakce vosků olivového oleje ⁽¹⁾

Píky methylesterů a ethylesterů mastných kyselin s retenční dobou 5 až 8 minut.

Vysvětlivky:

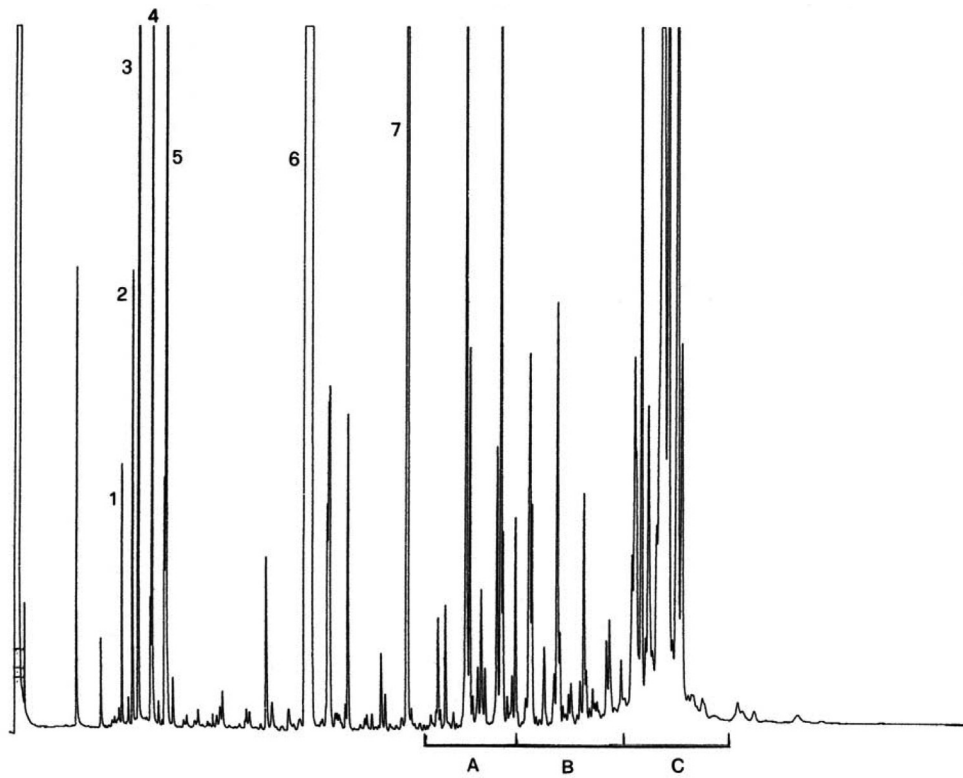
- I.S. = (vnitřní standard) Laurylcharidát
- 1 = Estery diterpenu
- 2+2' = Estery C₄₀
- 3+3' = Estery C₄₂
- 4+4' = Estery C₄₄
- 5 = Estery C₄₆
- 6 = Estery sterolů a triterpenické alkoholy

⁽¹⁾ Po eluaci esterů sterolů nesmí chromatogram vykazovat žádné výrazné píky (triacylglyceroly).

▼ M23

Obrázek 2

Methylestery, ethylestery a vosky v panenském olivovém oleji



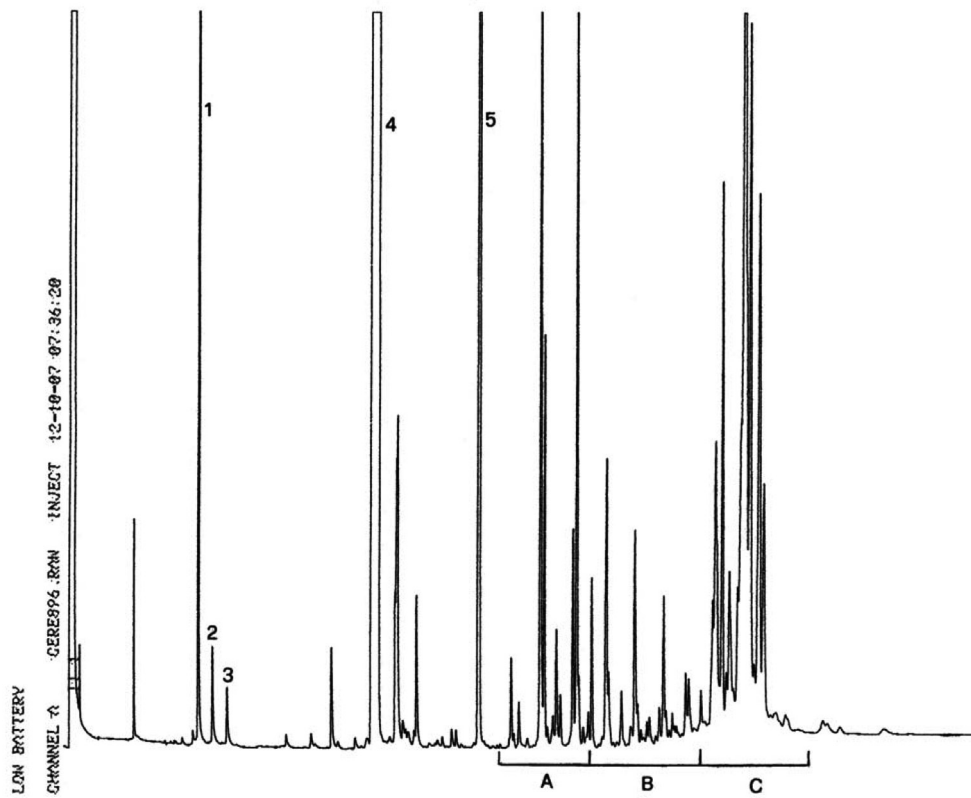
Vysvětlivky:

- 1 – Methyl C₁₆
- 2 – Ethyl C₁₆
- 3 – Vnitřní standard methylheptakaprinát
- 4 – Methyl C₁₈
- 5 – Ethyl C₁₈
- 6 – Squalene
- 7 – Vnitřní standard laurylcharidát
- A – Estery diterpenů
- B – Vosky
- C – Estery sterolů a triterpenů

▼M23

Obrázek 3

Methylestery, ethylestery a vosky v extra panenském olivovém oleji



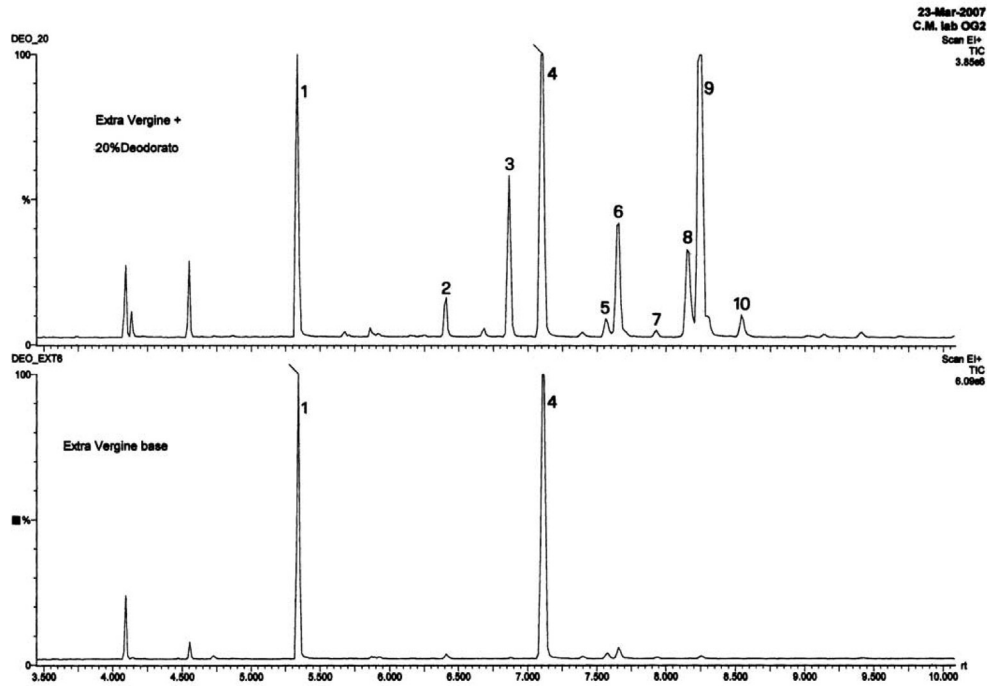
Vysvětlivky:

- 1 – Vnitřní standard methylheptakaprinát
- 2 – Methyl C₁₈
- 3 – Ethyl C₁₈
- 4 – Squalen
- 5 – Vnitřní standard laurylcharidát
- A – Estery diterpenů
- B – Vosky
- C – Estery sterolů a triterpenů

▼ M23

Obrázek 4

Část chromatogramu extra panenského olivového oleje a stejného oleje uměle obohaceného dezodorizovaným olejem



Vysvětlivky:

- 1 – Vnitřní standard methyl-myristát
- 2 – Methyl-palmitát
- 3 – Ethyl-palmitát
- 4 – Vnitřní standard methylheptakaprinát
- 5 – Methyl-linoleát
- 6 – Methyl-oleát
- 7 – Methyl-stearát
- 8 – Ethyl-linoleát
- 9 – Ethyl-oleát
- 10 – Ethyl-stearát

▼ M23*Dodatek A***Stanovení lineární rychlosti plynu**

Do plynového chromatografu nastaveného na normální pracovní podmínky se nastříkne 1:3 μl methanu (nebo propanu). Pomocí stopek se změří doba průchodu plynu kolonou od počátku vstřiku do okamžiku vzniku píků (t_M).

Lineární rychlost proudění v cm/s je dána poměrem L/t_M , kde L je délka kolony v cm a t_M je čas v sekundách, změřený stopkami.