

31991R2568

5.9.1991

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

L 248/1

## 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 <sup>(1)</sup>, naposledy pozměněné nařízením (EHS) č. 3577/90 <sup>(2)</sup>, a zejména na článek 35a uvedeného 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;

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 <sup>(3)</sup>, naposledy pozměněné nařízením (EHS) č. 1858/88 <sup>(4)</sup>;

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

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

#### Článek 1

1. Oleje s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodech 1, 2 a 3 přílohy I tohoto nařízení, jsou považovány za panenské olivové oleje ve smyslu bodu 1 písm. a), b) a c) přílohy nařízení č. 136/66/EHS.

2. Olej s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodu 4 přílohy I tohoto nařízení, je považován za lampantový panenský olivový olej ve smyslu bodu 1 písm. d) přílohy nařízení č. 136/66/EHS.

3. Olej s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodu 5 přílohy I tohoto nařízení, je považován za rafinovaný olivový olej ve smyslu bodu 2 přílohy nařízení č. 136/66/EHS.

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

<sup>(2)</sup> Úř. věst. L 353, 17.12.1990, s. 23.

<sup>(3)</sup> Úř. věst. L 128, 24.5.1977, s. 6.

<sup>(4)</sup> Úř. věst. L 166, 1.7.1988, s. 10.

4. Olej s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodu 6 přílohy I tohoto nařízení, je považován za olivový olej ve smyslu bodu 3 přílohy nařízení č. 136/66/EHS.

5. Olej s charakteristikami, které odpovídají charakteristikám stanoveným v bodu 7 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 8 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 9 přílohy I tohoto nařízení, je považován za olivový olej z pokrutin ve smyslu bodu 6 přílohy nařízení č. 136/66/EHS.

#### 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,
- stanovení alifatických alkoholů metodou uvedenou v příloze IV,
- stanovení obsahu sterolů metodou uvedenou v příloze V,
- stanovení erythrodiolu a uvaolu metodou uvedenou v příloze VI,
- stanovení nasycených mastných kyselin v triglyceridech vázaných v poloze 2 metodou uvedenou v příloze VII,
- stanovení obsahu trilinoleinu metodou uvedenou v příloze VIII,
- 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,
- důkaz o tom, že proběhla rafinace, metodou uvedenou v příloze XIII.

2. Hodnocení organoleptických vlastností provádí analytik — v případě potřeby s pomocí odborníka — postupem uvedeným v poznámkách k degustaci, na které odkazuje příloha XII. Pokud jsou výsledkem analýzy jiné charakteristiky než ty, které

vyplývají z označení výrobku, musí vzorek přezkoumat zkušební komise posuzovatelů v souladu s ustanoveními přílohy XII.

Případnou kontrolní analýzu provádí zkušební komise posuzovatelů podle stejných ustanovení.

Zkušební komise posuzovatelů posuzuje organoleptické vlastnosti v souvislosti s intervenčními opatřeními podle ustanovení přílohy XII.

#### Článek 3

Zavedení metod analýzy podle článku 2 nebrání do 31. října 1992 členským státům v používání jiných vyzkoušených a vědecky opodstatněných metod, pokud je povolen volný pohyb výrobků uznaných za vyhovující platným právním předpisům, jimiž se řídí metody Společenství. Před použitím jiných metod toto dotyčné členské státy sdělí Komisi.

Pokud metody poskytnou rozdílné výsledky, budou rozhodující výsledky získané metodou Společenství.

#### Článek 4

1. Za účelem posouzení organoleptických vlastností sestaví členské státy zkušební komise z posuzovatelů, kteří prošli odbornou přípravou podle pravidel popsanych v příloze XII.

2. Pokud budou mít členské státy na svém území potíže při sestavování zkušební komise posuzovatelů, mohou využít služeb zkušební komise posuzovatelů působící v jiném členském státu.

#### Článek 5

Doplňkové poznámky 2, 3 a 4 ke kapitole 15 kombinované nomenklatury se nahrazují doplňkovými poznámkami uvedenými v příloze XIV.

#### 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.

#### Článek 7

Pokud jde o přítomnost nežádoucích látek, jiných než na které odkazuje příloha XI, použijí se příslušné předpisy Společenství.

#### 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.

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.

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

V Bruselu dne 11. července 1991.

#### 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 1. ledna 1992, s výjimkou případů, kdy se jedná o intervenční opatření.

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.

*Za Komisi*

Ray MAC SHARRY

*člen Komise*

## PŘÍLOHA

## Obsah

	Strana
Příloha I: Charakteristiky olivového oleje .....	372
Příloha II: Stanovení volných mastných kyselin .....	374
Příloha III: Stanovení peroxidového čísla .....	376
Příloha IV: Stanovení obsahu a složení alifatických alkoholů pomocí kapilární plynové chromatografie .....	378
Příloha V: Stanovení obsahu a složení sterolů pomocí kapilární plynové chromatografie ...	383
Příloha VI: Stanovení erythrodiolu a uvaolu .....	391
Příloha VII: Stanovení nasycených mastných kyselin v triglyceridech vázaných v poloze 2 ...	393
Příloha VIII: Stanovení obsahu trilinoleinu .....	397
Příloha IX: Spektrofotometrická analýza v ultrafialové oblasti spektra .....	401
Příloha X A: Analýza methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií .....	405
Příloha X B: Příprava methylesterů mastných kyselin .....	413
Příloha XI: Stanovení těkavých halogenovaných rozpouštědel v olivovém oleji .....	417
Příloha XII: Organoleptické hodnocení panenského olivového oleje .....	418
Příloha XIII: Důkaz o tom, že proběhla rafinace .....	444
Příloha XIV: Doplnkové poznámky 2, 3 a 4 ke kapitole 15 kombinované nomenklatury .....	446
Příloha XV: Stanovení obsahu oleje v olivových pokrutinách.....	449
Příloha XVI: Stanovení jodového čísla .....	451

PŘÍLOHA I  
CHARAKTERISTIKY OLIVOVÉHO OLEJE

Kategorie	Obsah volných mastných kyselin %	Peroxidové číslo meq(O <sub>2</sub> )/kg	Halogenovaná roz-pouštědla mg/kg (1)	Alifatické alkoholy mg/kg	Nasyčené mastné kyselin-y-seliny v tri-gly-ceridech vázaných v poloze 2 %	Erythrodol + uvaol %	Trilinolein %	Cholesterol %	Brassikas-terol %	Campeste-rol %	Stigmas-terol %	Betasitoste-rol % (2)	Delta-7-stigmas-terol %	Steroly celkem mg/kg
1. Extra panenský olivový olej	M 1,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
2. Panenský olivový olej	M 2,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
3. Občejný panenský olivový olej	M 3,3	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
4. Panenský lampantový olivový olej	> 3,3	> 20	> 0,20	M 400	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	–	m 93,0	M 0,5	m 1 000
5. Rafinovaný olivový olej	M 0,5	M 10	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
6. Olivový olej	M 1,5	M 15	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
7. Surový olivový olej z pokrutin	m 2,0	–	–	–	M 1,8	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	–	m 93,0	M 0,5	m 2 500
8. Rafinovaný olivový olej z pokrutin	M 0,5	M 10	M 0,20	–	M 2,0	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800
9. Olivový olej z pokrutin	M 1,5	M 15	M 0,20	–	M 2,0	> 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800

M = maximum, m = minimum

(1) Celková horní mez pro sloučeniny zjištěné detektorem elektronového záchytu. Pro sloučeniny zjištěné individuálně platí horní mez 0,10 mg/kg.

(2) Delta-5, 23-stigmastadienol + chlosterol + sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5, 24-stigmastadienol.

Poznámka:

Pokud jakákoli charakteristika neodpovídá předepsaným mezním hodnotám, musí být olivový olej zařazen do jiné kategorie nebo označen jako nespĺňující požadavky na čistotu pro danou jakostní kategorii.

Kategorie	Složení kyselin							K <sub>270</sub>	K <sub>270</sub> po průchodu oxidem hlinitým (1)	ΔK	Senzorická analýza
	Mýristová %	Linolenová %	Arachidová %	Eikosanová %	Behenová %	Lignocerová %	K <sub>232</sub>				
1. Extra panenský olivový olej	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,40	M 0,20	M 0,10	M 0,01	≥ 6,5
2. Panenský olivový olej	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 5,5
3. Občejný panenský olivový olej	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 3,5
4. Panenský lampantový olivový olej	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,70	> 0,25	M 0,11	–	< 3,5
5. Rafinovaný olivový olej	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,40	M 1,20	–	M 0,16	–
6. Olivový olej	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,30	M 1,00	–	M 0,13	–
7. Surový olivový olej z pokrutin	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	–	–	–	–	–
8. Rafinovaný olivový olej z pokrutin	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 5,50	M 2,50	–	M 0,25	–
9. Olivový olej z pokrutin	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 5,30	M 2,00	–	M 0,20	–

## Poznámka

(1) V případě olivových olejů s obsahem volných mastných kyselin větší než 3,3 % a pokud je K<sub>270</sub> po průchodu oxidem hlinitým větší než 0,11, je nezbytné provést zkoušku na rafinaci podle přílohy XIII. Za účelem stanovení čistoty je nutno v případech, kdy hodnota K<sub>270</sub> přesahuje mez pro danou kategorii, stanovit extinkční koeficient znovu po průchodu oxidem hlinitým.

## PŘÍLOHA II

## STANOVENÍ VOLNÝCH MASTNÝCH KYSELIN

## 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(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 slijí 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.:

## 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 navází 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 dostačující 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:

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

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 dvou stanovení.



## 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 thiosíranu 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.
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 <sub>2</sub> /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.

## PŘÍLOHA IV

## STANOVENÍ OBSAHU A SLOŽENÍ ALIFATICKÝCH ALKOHOLŮ POMOCÍ KAPILÁRNÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

1. PŘEDMĚT  
Tato metoda popisuje postup stanovení obsahu a složení alifatických alkoholů v olejích a tucích.
2. PODSTATA METODY  
Zmýdelnění tukové látky, k níž je přidán 1-eikosanol jako vnitřní standard, pomocí ethanolického roztoku hydroxidu draselného a extrakce nezmýdelnitelných látek pomocí diethyletheru.  
Pomocí chromatografie se na vrstvě silikagelu napuštěného hydroxidem draselným od nezmýdelnitelného podílu oddělí alkoholová frakce. Alkoholy 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 Mikrostříkačky na 100 µl a 500 µl.
  - 3.7 Filtrační nálevka ze sintrovaného skla s pórovitou fritou G3 (pórovitost 15 až 40 µm) o průměru přibližně 2 cm a výšce 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 (vstříkové 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 rychlostí 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 µm.
  - 3.12 Mikrostříkačka pro plynovou chromatografii na 10 µl, opatřená tvrzenou jehlou.
4. CHEMIKÁLIE
  - 4.1 Hydroxid draselný ve formě ethanolického roztoku o koncentraci přibližně 2 mol/l: 130 g hydroxidu draselného (nejméně 85 %) se za současného chlazení rozpustí ve 200 ml destilované vody a doplní se do jednoho litru ethanolu. 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 ethanolickeho roztoku o koncentraci přibližně 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: směs alkoholů C<sub>20</sub> až C<sub>28</sub> v 5 % chloroformu.
- 4.12 0,2 % ethanolickeho 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 Standardní roztoky trimethylsilyletherů alifatických alkoholů C<sub>20</sub> až C<sub>28</sub>. Připraví se ze směsí čistých alkoholů těsně před použitím.
- 4.17 0,1 % roztok 1-eikosanolu v chloroformu (m/V) (vnitřní standard).
- 4.18 Nosné plyny: vodík a 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 µl se do baňky na 250 ml dá pro účely analýzy 0,1 % roztok 1-eikosanolu v chloroformu (4.17), obsahující množství 1-eikosanolu (je možné použít též 1-heneikosanol) rovnající se přibližně 10 % obsahu alifatickeho alkoholu v části vzorku, která má být odebrána za účelem analýzy. Například na 5 g vzorku se přidá 250 µl 0,1 % 1-eikosanolového roztoku při analýze olivového oleje nebo oleje ze semen, a 1 500 µl při analýze olivového oleje z pokrutin.
- Roztok (vnitřní standard) se odpaří do sucha pod proudem dusíku. Do stejné baňky se naváží přesně 5 g vysušeného přefiltrovaného vzorku.
- 5.1.2 Přidá se 50 ml ethanolickeho roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 2 mol/l, připojí se zpětný chladič a zahřeje se do mírného varu na parní lázni za nepřetržitého míchání během zahřívání, dokud nedojde ke zmýdelnění (roztok se vyčěří). 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 500 ml a propláchne 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 postřiku.
- 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 zvažované 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 alkoholové frakce

5.2.1 Příprava bazických desek

Silikagelové desky (4.4) se na 10 sekund zcela ponoří do ethanického roztoku hydroxidu draselného 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 14 dnů.

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

5.2.2 Vyvíjecí 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 v poměru 65:35 (V/V). Vyvíjecí komora se uzavře a nejméně půl hodiny ponechá v klidu, aby se mohla vytvořit rovnováha mezi parami a kapalinou. Na vnitřní povrch vyvíjecí komory je možné připevnit proužky filtračního papíru namočené v eluční směsi za účelem zkrácení doby vyvolávání přibližně o jednu třetinu a docílení stejnoměrnější, pravidelnější eluce složek.

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

5.2.3 Připraví se 5 % roztok nezmýdelnitelných látek (5.1.5) v chloroformu a 300 µl tohoto roztoku se pomocí mikrostříkačky na 100 µl 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 µl referenčního roztoku alifatického alkoholu (4.11) za účelem stanovení pásma alifatického alkoholu po dokončení vyvíjení.

5.2.4 Deska se umístí do vyvíjecí komory uvedené v odstavci 5.2.2. Teplota se udržuje mezi 15 a 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 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. Pásmo alifatického alkoholu se stanoví porovnáním skvrn vytvořených standardním roztokem. Toto pásmo a bezprostředně nad ním ležící pásmo triterpenického alkoholu se vyznačí černým značkovačem.

*Poznámka 4* Požadavek na odstranění pásma alifatického alkoholu a triterpenického alkoholu je určen možnou migrací některých alifatických alkoholů do pásma triterpenického alkoholu.

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 stěrkou a vakuově přefiltruje. Filtrát se shromáždí v baňce, připojené na filtrační nálevku.

Zbytek v nálevce se propláchne 3 × 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 alkoholovou frakcí.

5.3 Příprava trimethylsilyletherů

5.3.1 Do zkumavky obsahující alkoholovou frakci se přidá činidlo pro silylaci tvořené směsí pyridinu, hexamethyl-disilazanu a trimethyl-chlorsilanu v poměru objemových dílů 9:3:1 (poznámka 5) v množství 50 µl na každý mg alkoholů. Přitom je nutné zabránit jakékoli absorpci vlhkosti (poznámka 6).

*Poznámka 5* Roztoky připravené k použití jsou obchodně dostupné: silanizační činidla, jako například N, O-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid + 1 % trimethyl-chlor-silan, pro smíchání se stejným objemem bezvodého pyridinu.

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

*Poznámka 6* 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 zahřívat, dokud není dosaženo teploty nejméně o 20 °C vyšší, než je laboratorní teplota (viz poznámka 7). 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 píků nebo driftů.

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

*Poznámka 7* Teplota kondicionace musí být nejméně o 20 °C nižší než maximální teplota použitelná pro uvažovanou kapalnou fázi.

- 5.4.2 Výběr pracovních podmínek

- 5.4.2.1 Všeobecné pracovní podmínky jsou tyto:

— teplota kolony: počáteční izoterma se nastaví na 180 °C po dobu osmi minut a pak se naprogramuje růst o 5 °C/min do teploty 260 °C, a nakonec 15 minut při teplotě 260 °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,

— 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 alkoholu C<sub>26</sub> musí být 18 ± 5 minut,

— pík alkoholu C<sub>22</sub> musí být u olivového oleje 80 ± 20 % plného rozsahu a u oleje ze semen 40 ± 20 % plného rozsahu.

- 5.4.2.2 Výše uvedené požadavky se kontrolují opakovaným vstříkem standardní trimethylsilyletherové směsi alkoholů a pracovní podmínky se upraví tak, aby se dosahovalo optimálních výsledků.

- 5.4.2.3 Parametry pro integraci píků se nastaví tak, aby došlo ke správnému vyhodnocení ploch uvažovaných píků.

- 5.4.3 Provedení analýzy

- 5.4.3.1 Do 10 µl mikrostříkačky se natáhne 1 µl hexanu, poté 0,5 µl vzduchu a nakonec 0,5 až 1 µl zkušební 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 nastříkne roztok. Přibližně po pěti sekundách se jehla pomalu vytáhne.

- 5.4.3.2 Zaznamenávání je prováděno, dokud přítomná trimethylsilyletherová směs alifatických alkoholů 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.

Chromatogram alkoholové frakce panenského olivového oleje je znázorněn na obrázku 1.

- 5.4.5 Kvantitativní vyhodnocení

- 5.4.5.1 Pomocí integrátoru se vypočítají plochy píků 1-eikosanolu a alifatických alkoholů C<sub>22</sub> až C<sub>28</sub>.

5.4.5.2 Obsah jednotlivých alifatických alkoholů vyjádřený v mg/100 g tukové látky se vypočítá podle vzorce:

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

kde

$A_x$  = plocha píku alkoholu xv mm,

$A_s$  = plocha píku 1-eikosanolu v mm,

$m_s$  = hmotnost přidaného 1-eikosanolu v mg,

$m$  = hmotnost vzorku použitého pro stanovení v g.

## 6. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

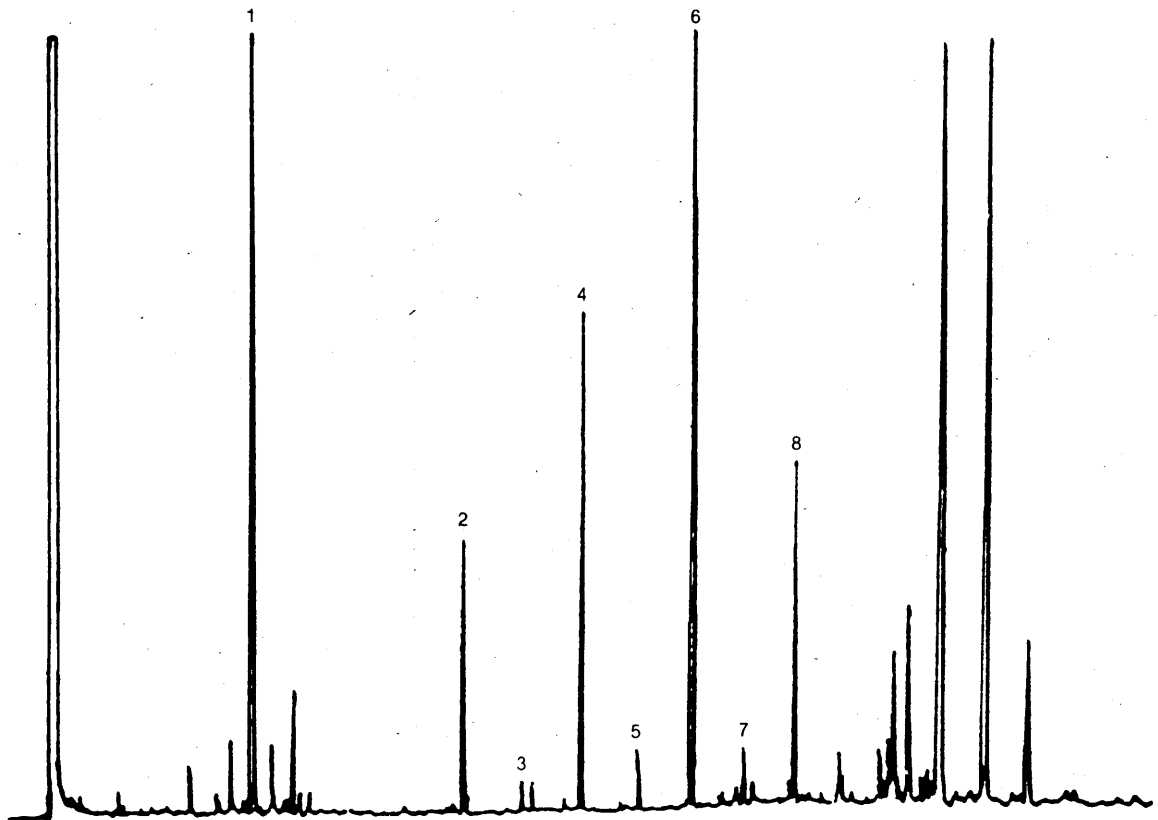
Uvádí se obsah jednotlivých alifatických alkoholů v mg/100 g tukové látky a souhrn „alifatické alkoholy celkem“.

### DODATEK

#### Stanovení lineární rychlosti plynu

Do plynového chromatografu nastaveného na normální pracovní podmínky se nastříkne 1 až 3  $\mu$ l methanu nebo propanu a pomocí stopky se změří 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.



**Obrázek 1** Plynový chromatogram sterolové frakce surového olivového oleje

- |                                   |                   |
|-----------------------------------|-------------------|
| 1 = eikosanol (vnitřní standard), | 5 = pentakosanol, |
| 2 = dokosanol,                    | 6 = hexakosanol,  |
| 3 = trikosanol,                   | 7 = heptakosanol, |
| 4 = tetrakosanol,                 | 8 = oktakosanol.  |

## 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  $\beta$ -cholestanol jako vnitřní standard, pomocí ethanolického roztoku hydroxidu draselného a extrakce nezmýdelnitelných látek pomocí diethyletheru.

Pomocí chromatografie na bazické silikagelové desce se z nezmýdelnitelného 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 Mikrostřičkačky na 100  $\mu$ l a 500  $\mu$ l.

3.7 Filtrační nálevka ze sintrovaného skla pórovitou fritou G3 (pórovitost 15 až 40  $\mu$ 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  $\pm 1$  °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  $\mu$ m.

3.12 Mikrostřičkačka pro plynovou chromatografii na 10  $\mu$ l s tvrzenou jehlou.

## 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 ethanolu. 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 ethanolomem.
- 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: 5 % roztok cholesterolu nebo fytoosterolu 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. Přípraví se z čistých sterolů nebo ze směsí sterolů získaných z olejů, které je obsahují, těsně před použitím.
- 4.17 0,2 % roztok  $\alpha$ -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  $\mu$ l se do baňky na 250 ml dá pro účely analýzy 0,2 % roztok  $\alpha$ -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  $\mu$ l 0,2 % roztoku  $\alpha$ -cholestanolu, a 1 500  $\mu$ l při analýze olejů ze semen nebo olivového oleje z pokrutin.
- V dusíku se vzorek odpaří do sucha a do stejné baňky se naváží přesně 5 g vysušeného přefiltrovaného vzorku.
- ivočišné nebo rostlinné oleje a tuky 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.
- 5.1.2 Přidá se 50 ml ethanolického roztoku hydroxidu draselného o koncentraci 2 mol/l, připojí se zpětný chladič a zahřeje se do mírného varu na parní lázni za nepřetržitého míchání během zahřívání, dokud nedojde ke zmýdelnění (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 propláchne 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 postřiku.

- 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.

Odstaní 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 ethanolického roztoku hydroxidu draselného 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 AlO (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.

- 5.2.2 Vyvíjecí 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). Vyvíjecí komora se uzavře a nejméně půl hodiny ponechá v klidu, aby se mohla vytvořit rovnováha mezi parami a kapalinou. Na vnitřní povrch vyvíjecí 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* Vyvíjecí 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 µl tohoto roztoku se pomocí mikrostříkačky na 100 µl 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 µl referenčního roztoku sterolů (4.11) za účelem stanovení sterolového pásma po dokončení vyvíjení.

- 5.2.4 Deska se umístí do vyvíjecí komory uvedené v odstavci 5.2.2. Teplota se udržuje mezi 15 a 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 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 skvrn vytvořených referenčním roztokem. Obrisy pásma podél okrajů fluorescence se vyznačí černým značkovacím.

- 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 stěrkou a vakuově přefiltruje. Filtrát se shromáždí v baňce, připojené na filtrační nálevku.

Zbytek v nálevce se propláchne 3 × 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-chlorosilanu v poměru 9:3:1 (V/V/V) (poznámka 4) v množství 50 µl 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.

- 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 zahřívat, 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 píků 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,
- 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 betasosterolu 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 zkušební 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 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, chlesterol, 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  $\alpha$ -cholestanolu a sterolů. Píky jakýchkoli sloučenin, které nejsou mezi sloučeninami uvedenými v tabulce 1. Koeficient odezvy  $\beta$ -cholestanolu musí být roven 1.

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

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

kde

$A_x$  = plocha píku sterolu x v mm,

$A_s$  = plocha  $\beta$ -cholestanolu v mm,

$m_s$  = množství přidaného  $\beta$ -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 píků sterolů se vypočítá podle vzorce:

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

kde

$A_x$  = plocha píku sterolu x,

$\Sigma A$  = celková plocha píků sterolů.

#### DODATEK

##### Stanovení lineární rychlosti plynu

Do plynového chromatografu nastaveného na normální pracovní podmínky se vstříkne 1 až 3  $\mu$ l methanu nebo propanu a pomocí stopky se změří 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.

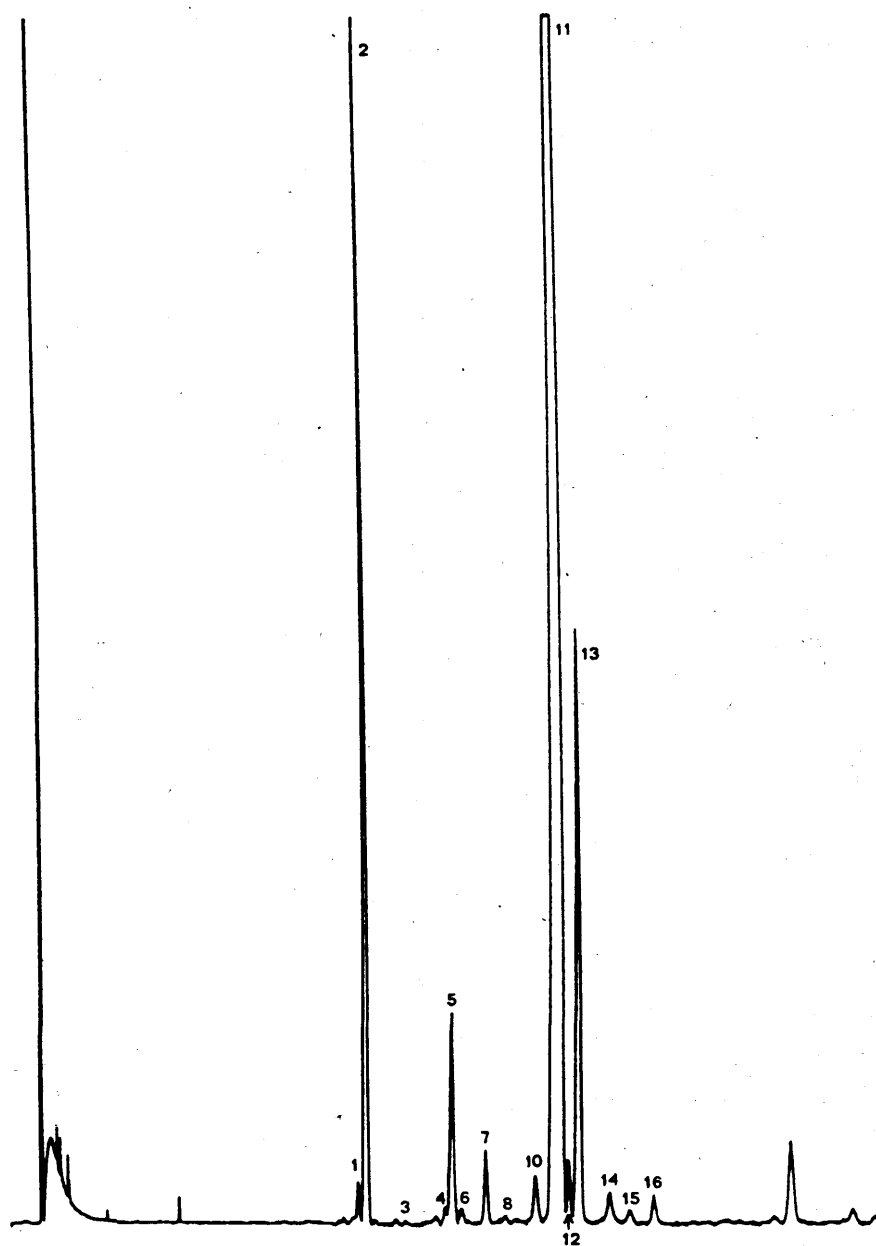
Tabulka 1

Relativní retenční časy sterolů

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

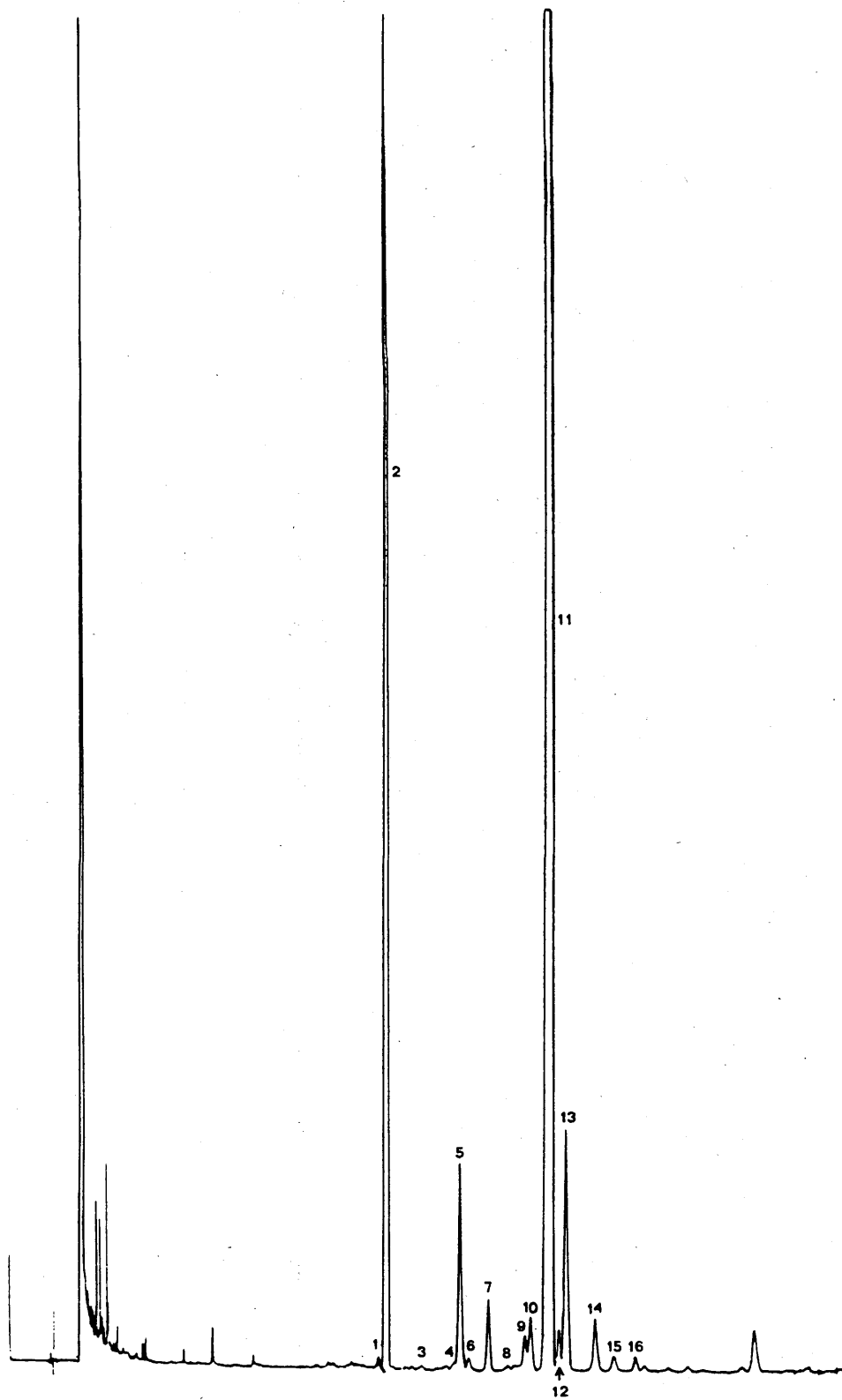
**Obrázek 1**

*Plynový chromatogram sterolové frakce surového olivového oleje*



## Obrázek 2

*Plynový chromatogram sterolové frakce rafinovaného olivového oleje*



## PŘÍLOHA VI

## STANOVENÍ ERYTHRODIOLU A UVAOLU

## ÚVOD

Erythrodiol (obvykle chápaní jako úhrn 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

Zmýdlení tukové látky pomocí ethanolickeho roztoku hydroxidu draselneho. Extrakce nezmýdelnitelných látek pomocí diethyletheru. Vycistění průchodem kolonou s oxidem hlinitym.

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 mikrotřídačky 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.

## 5.2.5 Deska se lehce a rovnoměrně postříká alkoholovým roztokem 2,7-dichlor-fluoresceinu a pozoruje se pod ultrafialovým zářením. Erythrodiolová pásma je možno stanovit porovnáním s 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 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. Tříkrát 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. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

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

kde

$A_1$  = plocha píku erythrodiolu v  $\text{mm}^2$

$A_2$  = plocha píku uvaolu v  $\text{mm}^2$

$\Sigma A_{\text{sterolů}}$  = celková plocha píků sterolů v  $\text{mm}^2$ .

Výsledek se vypočítá s přesností na jedno desetinné místo.

## PŘÍLOHA VII

## STANOVENÍ NASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN V TRIGLYCERIDECH VÁZANÝCH V POLOZE 2

## 1. PŘEDMĚT

Tato metoda popisuje postup stanovení složení frakce mastných kyselin v oleji nebo tuku, které jsou esterifikovány v poloze 2 (nebo ve vnitřní poloze) glyceridu.

## 2. OBLAST POUZITÍ

Tato norma platí pro oleje a tuky s bodem tání nižším než 45 °C a využívá specifického účinku pankreatické lipázy.

Není bezvýhradně použitelná pro oleje a tuky obsahující větší množství mastných kyselin s 12 nebo méně atomy uhlíku (kokosového a palmojadrového oleje, máselný tuk), nebo vysoce nenasycených mastných kyselin (s více než čtyřmi dvojnými vazbami) s 20 nebo více atomy uhlíku (rybí tuky a oleje z mořských živočichů), nebo mastných kyselin s kyslíkatými skupinami jinými než kyselinovými.

## 3. PODSTATA

Případná neutralizace kyselých olejů a tuků v rozpouštědle. Čištění průchodem kolonou s oxidem hlinitým. Parciální hydrolyza pomocí pankreatické lipázy během stanovené doby. Separace vzniklých monoglyceridů pomocí tenkovrstvé chromatografie a methanolýza těchto monoglyceridů. Analýza získaných methylesterů plynovou chromatografií.

## 4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 4.1 Baňka na 100 ml.
- 4.2 Baňka na 25 ml a se zábrusem.
- 4.3 1 m dlouhý vzduchový chladič, vhodný k připojení k baňce 4.2.
- 4.4 Baňka na 250 ml.
- 4.5 Kádinka na 50 ml.
- 4.6 Dělicí nálevka na 500 ml.
- 4.7 Skleněná chromatografická kolona o vnitřním průměru 13 mm a délce 400 mm s vložkou ze sintrovaného skla a kohoutem.
- 4.8 Odstředivková zkumavka na 10 ml se zabroušenou skleněnou zátkou.
- 4.9 Byreta na 5 ml, s hodnotou dílku 0,05 ml.
- 4.10 Stříkačka na 1 ml s tenkou jehlou.
- 4.11 Mikrostríkačka pro dávkování po 3 až 4 µl kapkách.
- 4.12 Nástroj na rozprostírání vrstev pro tenkovrstvou chromatografií.
- 4.13 Skleněné desky pro tenkovrstvou chromatografií, 20 × 20 cm.
- 4.14 Skleněná vyvíjecí komora pro tenkovrstvou chromatografií s víkem ze zabroušeného skla, pro desky 20 × 20.
- 4.15 Rozprašovač pro tenkovrstvou chromatografií.
- 4.16. Sušárna nastavitelná na teplotu 103 ± 2 °C.
- 4.17 Termostat nastavitelný na 30 až 45 °C s přesností na 0,5 °C.
- 4.18 Rotační odpařovač.
- 4.19 Vibrační elektrická třepací zařízení pro silné promíchávání odstředivkových zkumavek.
- 4.20 Ultrafialová lampa ke zkoumání desek pro tenkovrstvou chromatografií.

*Pro kontrolu aktivity lipázy*

- 4.21 pH metr.
- 4.22 Spirálovité míchadlo.
- 4.23 Byreta na 5 ml.
- 4.24 Stopky.

*Pro případnou přípravu lipázy:*

- 4.25 Laboratorní míchadlo vhodné pro disperze a směsi heterogenních materiálů.

## 5. CHEMIKÁLIE

- 5.1 *n* — hexan nebo, není-li k dispozici, petrolether (bod varu 30 až 50 °C), pro chromatografii.
- 5.2 2-propanol nebo 95 % ethanol (V/V), čistoty p. a.
- 5.3 2-propanol nebo ethanol, vodný roztok 1:1.
- 5.4 Diethylether, bez peroxidů.
- 5.5 Aceton.
- 5.6 Nejméně 98 % kyselina mravenčí (m/m).
- 5.7 Vytvájecí roztok: směs *n* — hexanu (5.1), diethyletheru (5.4) a kyseliny mravenčí (5.6) v poměru 70:30:1 (V/V/V).
- 5.8 Aktivovaný oxid hlinitý pro chromatografii, neutrální, stupeň jakosti Brockmann I.
- 5.9 Křemenný prach s pojivem, odpovídající jakosti pro tenkovrstvou chromatografii.
- 5.10 Pankreatická lipáza vhodné kvality (poznámky 1 a 2).
- 5.11 Hydroxid sodný, vodný roztok o koncentraci 120 g/l.
- 5.12 Kyselina chlorovodíková, vodný roztok o koncentraci 6 mol/l.
- 5.13 Chlorid vápenatý (CaCl<sub>2</sub>), vodný roztok o koncentraci 220 g/l.
- 5.14 Cholát sodný (enzymatické kvality), vodný roztok o koncentraci 1 g/l.
- 5.15 Tlumivý roztok: 1M vodný roztok trihydroxy-methyl-aminomethanu upravený na pH 8 přidáním kyseliny chlorovodíkové (5.12) (zkontrolujte potenciometrem).
- 5.16 Fenolftalein, roztok 10 g/l v 95 % ethanolu (V/V).
- 5.17 2', 7'-dichlor-fluorescein, roztok 2 g/l v 95 % ethanolu (V/V), upravený na mírně zásaditou reakci přidáním jedné kapky 1N roztoku hydroxidu sodného na 100 ml.

*Pro kontrolu aktivity lipázy:*

- 5.18 Neutralizovaný olej.
- 5.19 Hydroxid sodný, vodný roztok o koncentraci 0,1 mol/l.
- 5.20 Cholát sodný (enzymatické jakosti), vodný roztok o koncentraci 200 g/l.
- 5.21 Arabská guma, vodný roztok o koncentraci 100 g/l.

## 6. PŘÍPRAVA VZORKU

Pokud je hodnota kyselosti vzorku, stanovená podle přílohy II, nižší než 3 %, vyčistí se přímo průchodem přes oxid hlinitý podle odstavce 6.2.

Pokud je hodnota kyselosti vzorku, stanovená podle přílohy II, vyšší než 3 %, neutralizuje se zásadou za přítomnosti rozpouštědla podle odstavce 6.1 a poté se nechá projít oxidem hlinitým podle odstavce 6.2.

### 6.1 Neutralizace zásadou za přítomnosti rozpouštědla

Do dělicí nálevky (4.6) se převede přibližně 10 g surového olivového oleje a přidá se 100 ml hexanu (5.1), 50 ml 2-propanolu (5.2), několik kapek roztoku fenolftaleinu (5.16) a množství roztoku hydroxidu sodného (5.11) odpovídající hodnotě volné kyselosti oleje, plus 0,3 % navíc. Jednu minutu se důkladně protřepá, přidá se 50 ml destilované vody, znovu protřepá a nechá se usadit.

Po separaci se odstraní spodní mýdlová vrstva. Odstraní se také jakékoli mezilehlé vrstvy (sliz, nerozpustnou hmotu). Hexanový roztok neutralizovaného oleje se promyje následnými dávkami 25 až 30ml roztoku 2-propanolu (5.3), dokud růžové zbarvení fenolftaleinu nezmizí.

Odstraní se většina hexanu destilací ve vakuu v rotačním odpařovači (4.18), olivový olej se vysuší ve vakuu při teplotě 30 až 40 °C pomocí proudu čistého dusíku, dokud nebude hexan zcela odstraněn.

## 6.2 Čištění průchodem oxidem hlinitým

Připraví se suspenze 15 g aktivovaného oxidu hlinitého (5.8) v 50 ml hexanu (5.1) a za současného míchání se nalije do chromatografické kolony (4.7). Oxid hlinitý se nechá rovnoměrně usadit a umožní se, aby hladina rozpouštědla poklesla tak, aby byla 1 až 2 mm nad absorbentem. Do kolony se opatrně nalije roztok 5 g oleje ve 25 ml hexanu (5.1) a celý výtok z kolony se shromáždí v baňce (4.1).

## 7. PŘÍPRAVA CHROMATOGRAFICKÝCH DESEK

Skleněné desky (4.13) se důkladně vyčistí ethanolem, petroletherem a acetonem, aby se odstranila jakákoli stopa tuku.

Do Erlenmeyerovy baňky (4.4) se nasype 30 g křemenného prachu (5.9). Přidá se 60 ml destilované vody. Uzavře se a jednu minutu důkladně protřepe. Kaše se okamžitě přenesení do nanášecího zařízení (4.12) a desky se pokryjí vrstvou silnou 0,25 mm.

Desky se suší 15 minut na vzduchu a poté jednu hodinu v sušárně (4.16) při teplotě  $103 \pm 2$  °C. Desky se před použitím vychladí v exsíkátoru na laboratorní teplotu.

Hotové desky jsou obchodně dostupné.

## 8. POSTUP

### 8.1 Hydrolýza za přítomnosti pankreatické lipázy

Do odstředivkové zkumavky (4.8) se naváží přibližně 0,1 g připraveného vzorku; pokud je vzorkem kapalný olej, postupujte přímo níže uvedeným způsobem.

Přidá se 20 mg lipázy (5.10) a 2 ml tlumivého roztoku (5.15). Dobře, ale opatrně se protřepe a pak se přidá 0,5 ml roztoku choluátu sodného (5.14) a 0,2 ml roztoku chloridu vápenatého (5.13). Zkumavka se uzavře zátkou se zábrusem, opatrně se protřepe (nelze dopustit zvlhčení zátky), okamžitě se vloží do termostatu (4.17) udržovaného na teplotě  $40 \pm 0,5$  °C a ručně se přesně jednu minutu protřepe.

Zkumavka se vyjme z termostatu a důkladně se přesně dvě minuty protřepe pomocí elektrického třepacího zařízení (4.19).

Okamžitě se vychladí pod tekoucí vodou, přidá se do ní 1 ml kyseliny chlorovodíkové (5.12) a 1 ml diethyletheru (5.4). Uzavře se a důkladně promíchá na elektrickém třepacím zařízení. Nechá se usát, v případě potřeby odstředí, a pomocí stříkačky (4.10) se odebere organická vrstva.

### 8.2 Separace monoglyceridů pomocí tenkovrstvé chromatografie

Extrakt se pomocí mikrostríkačky (4.11) nastříkne jako co nejrovnoměrnější a co nejtenčí pruh na tenkovrstvou desku přibližně 1,5 cm od dolního okraje chromatografické desky. Deska se vloží do dobře nasycené vývojové komory (4.14) a nechá se vyvíjet ve vyvíjecím roztoku (5.7) přibližně při 20 °C, dokud čelo roztoku nebude přibližně 1 cm od horního okraje desky.

Deska se usuší na vzduchu při stejné teplotě, jakou má vyvíjecí komora a postříká se roztokem 2', 7'-dichlorfluoresceinu (5.17). Pod ultrafialovým světlem (4.20) se označí pásmo monoglyceridů ( $R_f$  přibližně 0,035).

### 8.3 Analýza monoglyceridů plynovou chromatografií

Pomocí špachtle se odstraní pásmo získané v odstavci 8.2 (je nutno se vyvarovat odstranění složek, které zůstaly na základní linii) a převedte je do methylační baňky (4.2).

Získaný oxid křemičitý se upraví přímo metodami uvedenými v příloze XB, s cílem převedení monoglyceridů na methylestery; potom se estery analyzují pomocí plynové chromatografie, jak je popsáno v příloze XA.

## 9. VYJÁDRĚNÍ VÝSLEDKŮ

Složení mastných kyselin vázaných v poloze 2 se vypočítá s přesností na jedno desetinné místo (poznámka 3).

## 10. POZNÁMKY

*Poznámka 1* Kontrola aktivity lipázy

Připraví se olejová emulze promícháním směsi 165 ml roztoku arabské gumy (5.21), 15 g drceného ledu a 20 ml neutralizovaného oleje (5.18) vhodným třepacím zařízením.

Do kádinky (4.5) se převede 10 ml olejové emulze, poté se postupně přidá 0,3 ml roztoku cholátu sodného (5.20) a 20 ml destilované vody.

Kádinka se vloží do termostatu udržovaného na teplotě  $37 \pm 0,5$  °C (poznámka 4); vloží se elektrody pH metru (4.21) a spirálovité míchadlo (4.22).

Pomocí byrety (4.23) se po kapkách přidává roztok hydroxidu sodného (5.19), dokud hodnota pH nedosáhne 8,5.

Přidá se dostatečné množství vodní suspenze lipázy (viz níže). Jakmile pH metr začne ukazovat pH 8,3, zapnou se stopky (4.24) a přikapává se roztok hydroxidu sodného (5.19) takovou rychlostí, aby se udržovala hodnota pH 8,3. Zaznamená se objem spotřebovaného zásaditého roztoku za minutu.

Pozorování se zaznamená ve formě grafu, jehož nezávisle proměnnou je čas a závisle proměnnou objem zásaditého roztoku v ml potřebný pro udržení konstantní hodnoty pH. Výsledný graf musí být lineární.

Výše zmíněná suspenze lipázy je vodní suspenzí 1:1000 (m/m). Při každé zkoušce se použije takové množství této suspenze, aby se během čtyř až pěti minut spotřeboval přibližně 1 ml zásaditého roztoku. Obvykle je zapotřebí přibližně 1 až 5 mg prášku.

Lipázovou jednotkou se rozumí množství enzymu, které uvolní 10 mikroekvivalentů kyseliny za minutu. Aktivity A použitého prášku vyjádřená v lipázových jednotkách na 1 mg je pak dána vzorcem:

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

kde V je objem v ml roztoku hydroxidu sodného (5.19) spotřebovaného za minutu, vypočítaný z grafu, a m je hmotnost použitého zkušební vzorku prášku v mg.

*Poznámka 2* Příprava lipázy

Lipázy s dostatečnou aktivitou jsou obchodně dostupné. Je ale rovněž možné je připravit v laboratorii 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 v míchadle (4.25) smíchá s 2,5 l bezvodého acetonu a poté odstředí. Zbytek se extrahuje třikrát pomocí stejného množství 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 skladovat v ledničce.

*Poznámka 3* V každém případě se doporučuje stanovit složení veškerých mastných kyselin ve stejném vzorku, neboť porovnání se složením kyselin vázaných v poloze 2 pomůže při vyhodnocení získaných čísel.*Poznámka 4* Teplota hydrolyzy je 37 °C, je-li použit kapalný olej. V případě zkušební vzorku se však nastaví na 40 °C, aby se umožnila analýza tuků s bodem tání až do 45 °C.

## PŘÍLOHA VIII

## STANOVENÍ OBSAHU TRILINOLEINU

## 1. PŘEDMĚT

Stanovení složení triglyceridů v olejích vyjádřených jako ekvivalentní počet atomů uhlíku pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Tato metoda popisuje způsob separace a kvantitativního stanovení složení triglyceridů v rostlinných olejích vyjádřených molekulární hmotností a stupněm nenasyčenosti jako funkce ekvivalentního počtu atomů uhlíku (viz poznámka 1).

## 2. OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda platí pro všechny rostlinné oleje obsahující triglyceridy mastných kyselin s dlouhými řetězci. Metoda je zvláště vhodná pro zjišťování přítomnosti malých množství polovysychavých olejů (bohatých na kyselinu linolovou) v rostlinných olejích obsahujících kyselinu olejovou jako převládající nenasyčenou mastnou kyselinu, jako například v olivovém oleji.

## 3. PODSTATA

Separace triglyceridů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (s reverzní polární fází) podle jejich ekvivalentního počtu atomů uhlíku a interpretace chromatogramů.

## 4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Vysoce účinný kapalinový chromatograf umožňující termostatickou regulaci teploty kolony.

4.2 Jednotka injektoru pro dodání 10  $\mu$ l vzorku.

4.3 Detektor: diferenciální refraktometr. Citlivost celé stupnice musí mít úroveň nejméně  $10^{-4}$  jednotky indexu lomu.

4.4 Kolona: korozivzdorná trubice o délce 250 mm s vnitřním průměrem 4,5 mm, naplněná oxidem křemičitým o rozměru částic 5  $\mu$ m s obsahem uhlíku 22 až 23 % ve formě oktadecylsilanu (poznámka 2).

4.5 Zapisovač a/nebo integrátor.

## 5. CHEMIKÁLIE

Všechna činidla musí mít čistotu p. a. Eluční rozpouštědla musí být odplyněná a mohou být použita několikrát, aniž by to mělo vliv na separaci.

5.1 Chloroform.

5.2 Aceton.

5.3 Acetonitril.

5.4 Eluční rozpouštědlo: acetonitril + aceton (poměr je třeba nastavit tak, aby došlo k požadované separaci; je nutno začít se směsí 50: 50).

5.5 Solubilizační rozpouštědlo: aceton nebo směs acetonu a chloroformu 1: 1.

5.6 Referenční triglyceridy: mohou být buď použity komerční triglyceridy (tripalmitin, triolein atd.), v tomto případě se retenční časy budou vynášet v souladu s ekvivalentním počtem atomů uhlíku, anebo se referenční chromatogram získá ze sojového oleje (viz poznámky 3 a 4 a obrázky 1 a 2).

## 6. PŘÍPRAVA VZORKŮ

Z analyzovaných vzorků se připraví 5 % roztok, do kterého se naváží  $0,5 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$  vzorku do odměrné baňky na 10 ml a doplněním do 10 ml solubilizačním rozpouštědlem (5.5).

## 7. POSTUP

- 7.1 Připraví se chromatografický systém. Eluční rozpouštědlo (5.4) se čerpá rychlostí 1,5 ml/min, aby došlo k vyčištění systému. Čekajte, dokud se nevytvoří stabilní základní linie.

Nastříknete 10 µl vzorku připraveného podle odstavce 6.

## 8. VÝPOČET A VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

Použijte metodu vnitřní normalizace, tj. předpokládejte, že součet ploch píků odpovídajících různým triglyceridům je 100 %. Relativní procentní podíl každého triglyceridu se vypočítá podle vzorce

$$\% \text{ triglyceridu} = \frac{\text{plocha píku}}{\text{součet ploch píků}} \times 100$$

Výsledek se vypočítá s přesností na jedno desetinné místo.

*Poznámka 1* Pořadí eluce je možné stanovit vypočtením ekvivalentních počtů atomů uhlíku, často definovaných jako  $ECN = CN - 2n$ , kde  $CN$  je počet atomů uhlíku a  $n$  je počet dvojných vazeb. Výpočet může být mnohem přesnější, pokud se bere v úvahu původ dvojných vazeb. Pokud  $n_o$ ,  $n_1$  a  $n_{1n}$  jsou počty dvojných vazeb patřících kyselině olejové, linolové a linolenové, ekvivalentní počet atomů uhlíku se vypočítá podle vzorce

$$ECN = CN - d_o n_o - d_1 n_1 - d_{1n} n_{1n}$$

kde koeficienty  $d_o$ ,  $d_1$  a  $d_{1n}$  je možné vypočítat pomocí referenčních triglyceridů. Za podmínek předepsaných pro tuto metodu platí přibližně tento vztah

$$ECN = CN - [2,60 n_o] - [2,35 n_1] - [2,17 n_{1n}]$$

*Poznámka 2* Příklady: Lichrosorb (Merck) RP18, č. 50333;  
Lichrospher nebo ekvivalent (Merck) 100 CH18, č. 50377.

*Poznámka 3* Pomocí několika referenčních triglyceridů je rovněž možné vypočítat rozlišení vzhledem k trioleinu

$$\alpha = RT' / RT'_{\text{oleinu}}$$

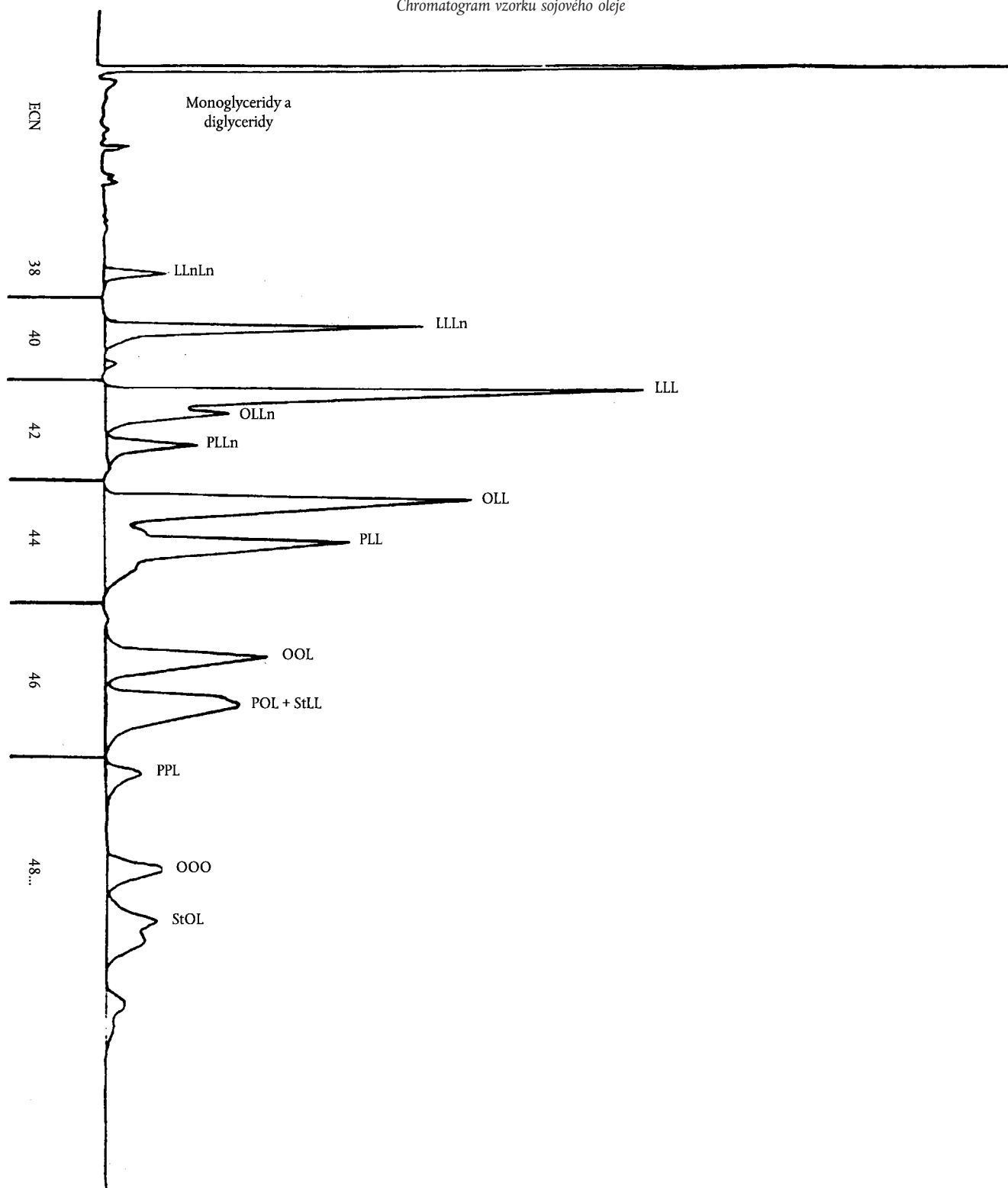
pomocí redukovaného retenčního času  $RT' = RT - RT_{\text{rozpuštědla}}$

Grafické vyjádření funkce  $\log \alpha = f$  (počet dvojných vazeb) umožňuje stanovit retenční časy všech triglyceridů obsažených v mastných kyselinách, které se vyskytují též v referenčních triglyceridech — viz obrázek 2.

*Poznámka 4* Účinnost kolony musí umožnit zřetelnou separaci píku trilinoleinu od sousedních píků triglyceridů, které mají jen trochu rozdílný retenční čas.

Obrázek 1

Chromatogram vzorku sojového oleje



P = palmitic acid

St = stearic acid

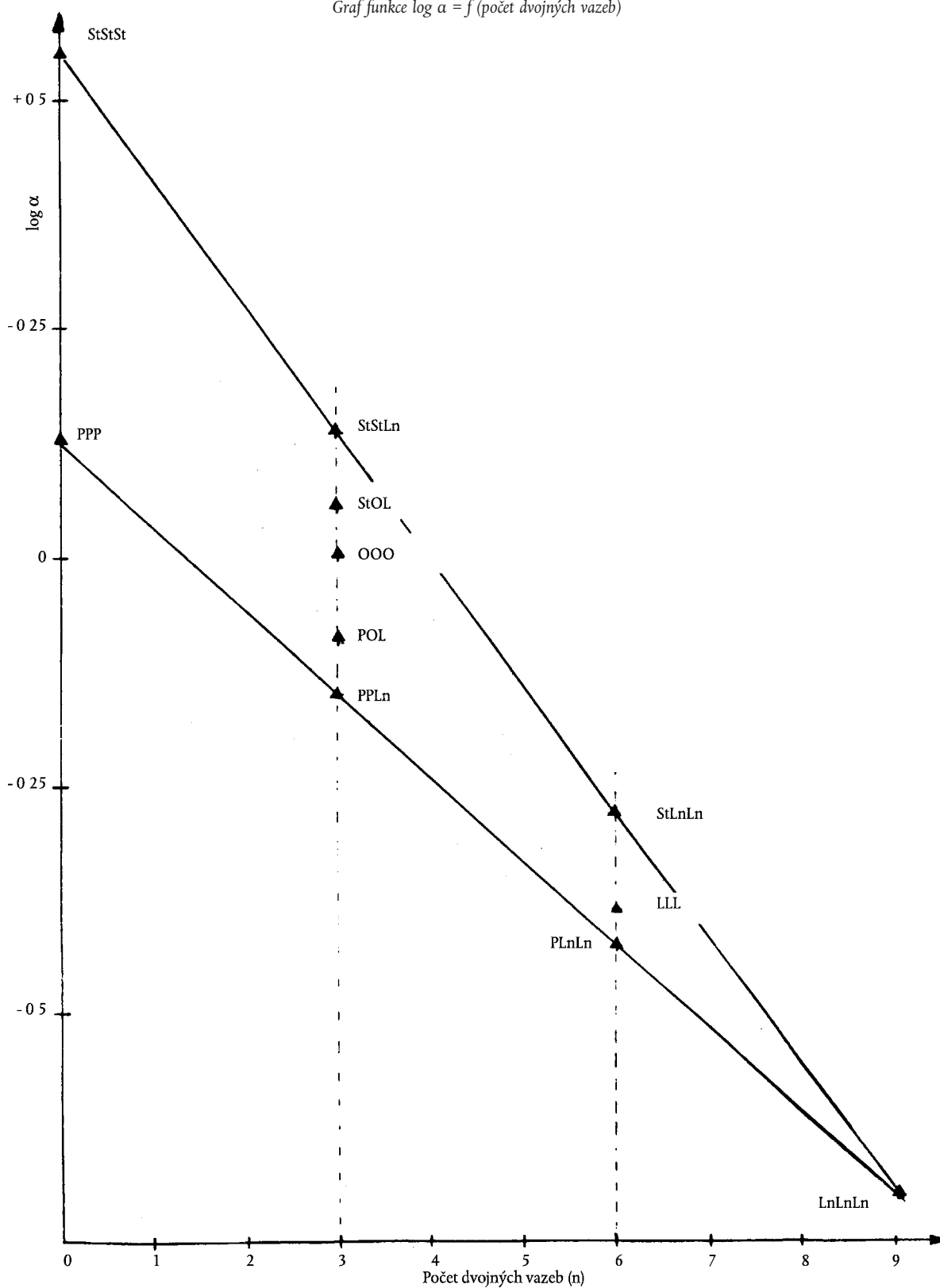
O = oleic acid L

L = linoleic acid

Ln = linolenic acid



Obrázek 2

Graf funkce  $\log \alpha = f(\text{počet dvojných vazeb})$ 

La = kyselina laurová  
 St = kyselina stearová  
 Ln = kyselina linolenová

My = kyselina myristová  
 O = kyselina olejová

P = kyselina palmitová  
 L = kyselina linolová

## 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.

3.4 Chromatografická kolona o délce 540 mm a průměru 35 mm s vypouštěcí trubicí o přibližném průměru 10 mm.

## 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; nebo

— jiné vhodné rozpouštědlo schopné zcela rozpustit tukovou složku (např. ethanol v případě ricinového oleje).

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.

## 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 homogениzovat a přefiltrovat při teplotě nejvýše 10 °C nad jejich bodem tání.

5.2 Navází 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. VYJÁDRĚNÍ VÝSLEDKŮ

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

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

kde

$K_{\lambda}$  = specifická extinkce při vlnové délce  $\lambda$ ,

$E_{\lambda}$  = extinkce při vlnové délce  $\lambda$ ,

$c$  = koncentrace analytického roztoku v g/100 ml zkušební roztoku,

$s$  = 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  $\Delta K$ , 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.

## 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 oxidu hlinitého

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.

---

## 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  $0,200 \pm 0,005$ .
-

## 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“.

*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 korozi vzdorná ocel), a má mít následující rozměry:

- délka: 1 m až 3 m. Relativně kratší kolony by mohly být použity za přítomnosti mastných kyselin s dlouhým řetězcem (nad C<sub>20</sub>). Při analýzách kyselin se 4 nebo 6 uhlíkovými atomy se doporučuje použít kolonu o délce 2 m;
- vnitřní průměr: 2 až 4 mm.

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

*Poznámka 4* Může být použit systém s dvěma náplňovými kolonami.

3.1.3.2 Náplň zahrnuje tyto části:

- 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;
- stacionární fáze*: polární fáze polyesterového typu (např. diethylenglykoljantarát polyester, butandioljantarát polyester, ethylenglykoladipat 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.

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

*Poznámka 5* Při použití polárních polysiloxanů je nebezpečí obtížné identifikace a separace kyseliny linolenové a kyselin C<sub>20</sub>.

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). Kolono 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:

- 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 korekcí na opravu základní linie.

## 4. POSTUP

Postup popsáný 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 změny 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



4.1.1.2 *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 methyloleátu (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:

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

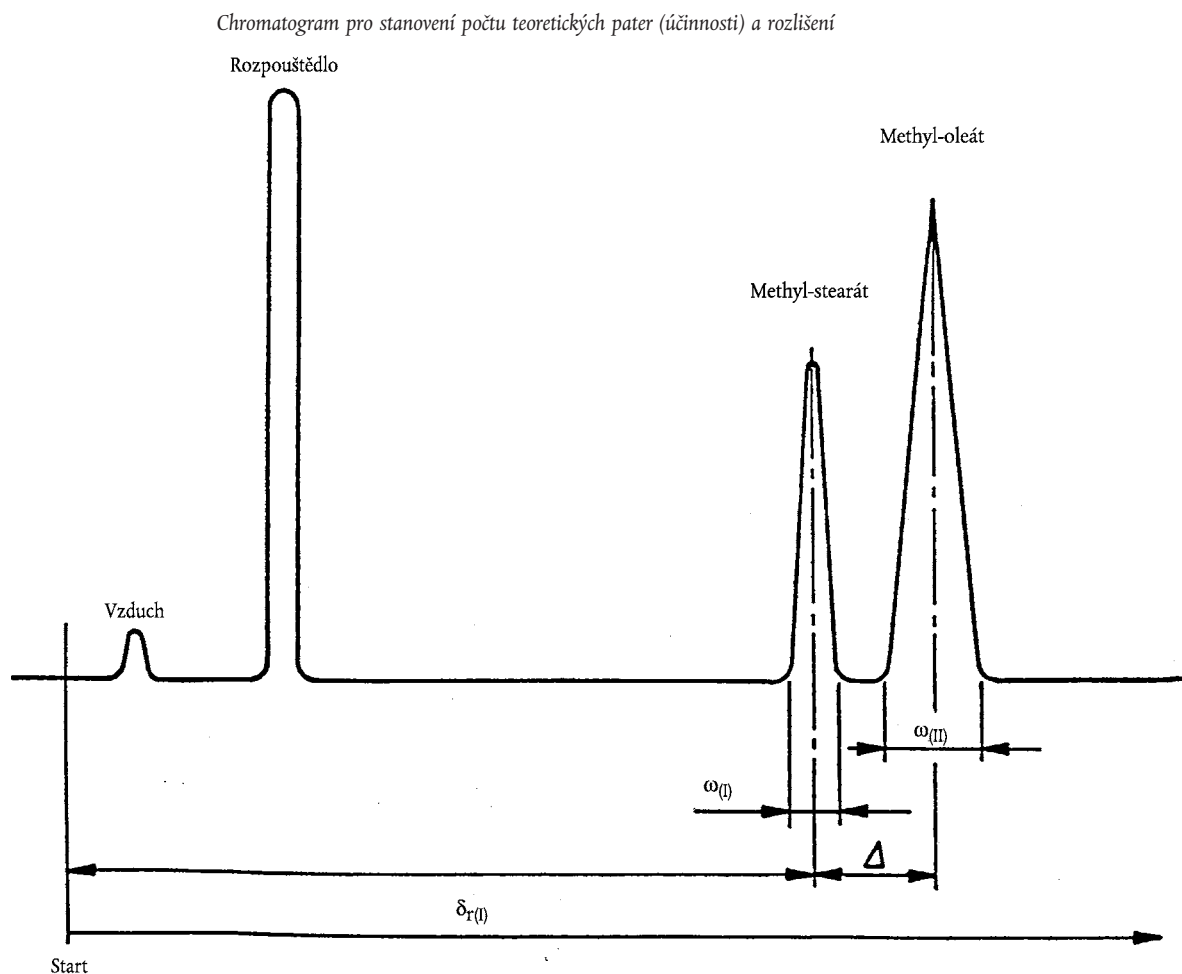
kde

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

$\omega_1$  a  $\omega_2$  jsou šířky v mm píků methylstearátu a methyloleátu změřené mezi průsečíky tangent vedenými inflexními body na píku a základní linii;

$\Delta$  je vzdálenost mezi maximy píků methylstearátu a methyloleátu v mm.

Obrázek 1



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  $\mu$ l až 2  $\mu$ l 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 nastříkuje se 0,1  $\mu$ l až 1  $\mu$ l 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.

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:

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

kde

$A_i$  je plocha píku odpovídající složce *i*,

$\Sigma A$  je součet ploch všech píků.

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:

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

kde

$m_i$  je hmotnost složky *i* v referenční směsi,

$\Sigma m$  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:

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

kde

$A_i$  je plocha píku odpovídající složce  $i$ ,

$\Sigma A$  součet ploch všech píků.

Korekční faktor se vypočítá podle vzorce

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

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:

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

Výsledky se vypočítají s přesností na jedno desetinné místo.

#### 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.

#### 6. 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 $\mu\text{m}$ a 200 $\mu\text{m}$
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 $\mu\text{l}$ až 2 $\mu\text{l}$

#### 7. 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.

## PŘÍLOHA X B

**PŘÍPRAVA METHYLESTERŮ MASTNÝCH KYSELIN PODLE PŘÍL. VI HL. I A II NAŘÍZENÍ (EHS)  
Č. 72/77 NEBO METODOU POPSANOU NÍŽE**

## PŘEDMLUVA

Výběr metody závisí na složení mastných kyselin, na obsahu volných mastných kyselin ve zkoumané tukové látce a na uvažované analýze plynovou chromatografií.

V úvahu přicházejí

- pro tukové látky obsahující mastné kyseliny s méně než 12 atomy uhlíku pouze postup používající hermeticky uzavřenou ampuli nebo dimethylsulfát;
- pro tukové látky s obsahem volných mastných kyselin více než 3 % pouze postup používající kyselinu chlorovodíkovou a methanol nebo dimethylsulfát;
- pro stanovení trans-isomerů plynovou chromatografií pouze postup používající methylát sodný nebo dimethylsulfát;
- postup používající směs methanolu, hexanu a kyseliny sírové je nutno použít pro přípravu methylesterů z malých množství tukových látek po jejich separaci pomocí tenkovrstvé chromatografie.

Přítomnost nezmýdelnitelných látek není nutno brát v úvahu, pokud nepřekročí 3 %; v opačném případě je nutné připravit methylestery z mastných kyselin.

## 1. PODSTATA A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda popisuje pět způsobů přípravy methylesterů z tukových látek:

- a) s methylátem sodným;
- b) s methylátem sodným v hermeticky uzavřené ampuli;
- c) s methanolem roztokem kyseliny chlorovodíkové v hermeticky uzavřené ampuli;
- d) s dimethylsulfátem;
- e) se směsí methanolu, hexanu a kyseliny sírové.

**Metoda A**

## 2. PODSTATA

Analyzovaná tuková látka se zahřívá pod zpětným chladičem spolu s methanolem a methylátem sodným. Získané methylestery se extrahují pomocí diethyletheru.

## 3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 3.1 Baňka na 100 ml se zábrusem, opatřená zpětným chladičem nahoře uzavřeným sodnovápenatou trubicí.
- 3.2 Odměrky na 50 ml.
- 3.3 Pipeta na 5 ml dělená po 0,1 ml.
- 3.4 Dělicí nálevky na 250 ml.
- 3.5 Baňka na 200 ml.

## 4. CHEMIKÁLIE

- 4.1 Bezvodý methanol.

- 4.2 Přibližně 1 % roztok methylátu sodného v methanolu, připravený rozpuštěním 0,34 g kovového sodíku ve 100 ml bezvodého methanolu.
- 4.3 Ethylether.
- 4.4 10 % roztok chloridu sodného.
- 4.5 Petrolether s bodem varu 40 až 60 °C.
5. POSTUP
- 5.1 Do baňky na 100 ml se naváže 2 g tukové látky, vysušené síranem sodným a přefiltrované. Přidá se 35 ml methanolu, nasadí se chladič a nechá se vařit několik minut pod zpětným chladičem.
- 5.2 Zahřívání se přeruší, odpojí se chlazení a rychle se přidá 3,5 ml roztoku methylátu sodného. Znovu se nasadí chladič a nechá se vařit pod zpětným chladičem nejméně 3 hodiny. Methylace je dokončena, jakmile je zkapalněna veškerá tuková látka a reakční směs je při laboratorní teplotě dokonale čirá.
- 5.3 Reakční směs se vychladí a nalije do dělicí nálevky na 250 ml, přidá se 35 až 40 ml diethyletheru, 100 ml vody a 5 až 6 ml 10 % roztoku chloridu sodného. Protřepe se a umožní se separace vrstev. Vodná fáze se vypustí do druhé dělicí nálevky a znovu se extrahuje pomocí 25 ml diethyletheru.  
Do spojených etherových extraktů se přidá 50 ml petroletheru s bodem varu 40 až 60 °C. Voda se oddělí a potom se odstraní.  
Etherová fáze se třikrát propláchne 10 až 15 ml vody, vysuší se síranem sodným a přefiltruje do baňky na 200 ml.  
Rozpouštědlo se z vodní lázně vydestiluje a zbytek se vysuší v proudu čistého dusíku.

#### Metoda B

2. PODSTATA  
Analyzovaná tuková látka se upravuje methylátem sodným v methanolovém roztoku v hermeticky uzavřené ampuli při teplotě 85 až 90 °C.
3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 3.1 Silnostěnná skleněná ampule na přibližně 5 ml (výška 40 až 45 mm, průměr 14 až 16 mm).
- 3.2 Pipeta na 1 ml, dělená po 0,1 ml.
4. CHEMIKÁLIE
- 4.1 Přibližně 1,5 % roztok methylátu sodného v methanolu. Tento roztok je připraven rozpuštěním 0,50 g kovového sodíku ve 100 ml bezvodého methanolu.
5. POSTUP
- 5.1 Do skleněné ampule se převede 2 g tukové látky, předem vysušené síranem sodným a přefiltrované. Přidá se 0,3 g (přibližně 0,4 ml) roztoku methylátu sodného a ampule se hermeticky zataví.
- 5.2 Ampule se na dvě hodiny ponoří do vodní lázně o teplotě 85 až 90 °C a čas od času se protřepe. Esterifikační proces je dokončen, jakmile je obsah ampule po usazení glycerinu a zbytku činidel čirý.
- 5.3 Ampule se vychladí na laboratorní teplotu. Otevře se v okamžiku, kdy mají být methylestery použity. Před umístěním do zařízení pro plynovou chromatografii není nutná žádná další úprava.

#### Metoda C

2. PODSTATA  
Analyzovaná tuková látka se upravuje methanolovým roztokem kyseliny chlorovodíkové v hermeticky uzavřené ampuli při teplotě 100 °C.
3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 3.1 Silnostěnná skleněná ampule na přibližně 5 ml (výška 40 až 45 mm, průměr 14 až 16 mm).

- 3.2 Kalibrované pipety na 1 ml a 2 ml.
4. CHEMIKÁLIE
- 4.1 12 % methanolvý roztok kyseliny chlorovodíkové. Tento roztok je připraven z plynné kyseliny chlorovodíkové a bezvodého methanolu (poznámka 1).
- 4.2 Hexan pro plynovou chromatografii.
5. POSTUP
- 5.1 Do skleněné ampule se převede 0,2 g tukové látky, předem vysušené síranem sodným a přefiltrované, a 2 ml methanolového roztoku kyseliny chloro-vodíkové. Ampule se hermeticky zataví.
- 5.2 Ampule se na 40 minut ponoří do vodní lázně o teplotě 100 °C.
- 5.3 Ampule se vychladí pod tekoucí vodou, otevře se, přidá se 2 ml destilované vody a 1 ml hexanu. Odstředí se a odebere se hexanovou fází, která je připravena k použití.

### Metoda D

2. PODSTATA
- Analyzovaná tuková látka se zmýdelní pomocí methanolového roztoku hydroxidu draselného a poté upravena dimethylsulfátem. Po přidání kyseliny chlorovodíkové se vytvořené methylestery automaticky oddělí. Velmi čisté methylestery se získají následnou úpravou oxidem hlinitým.
3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY
- 3.1 Silnostěnná zkumavka na přibližně 20 ml se zábrusovou skleněnou zátkou 10/19 a bezpečnostní svorkou.
- 3.2 Zpětné chladiče se zábrusy 10/19.
- 3.3 Skleněné filtry se sintrovaným kotoučem o rozměru G 2 a průměru 20 mm.
- 3.4 Skleněné zkumavky na přibližně 10 ml s kónickým dnem.
- 3.5 Stříkačka na 1 ml a 5 ml.
4. CHEMIKÁLIE
- 4.1 10 % roztok hydroxidu draselného v methanolu pro plynovou chromatografii.
- 4.2 Indikátor: 0,05 % roztok bromkresolové zeleně v methanolu.
- 4.3 Dimethylsulfát (d = 1,335 při 15 °C).
- 4.4 Koncentrovaná kyselina chlorovodíková (d = 1,19) rozpuštěná v poměru 1: 1 v methanolu pro plynovou chromatografii.
- 4.5 Oxid hlinitý standardizovaný podle Brockmanna pro adsorpční chromatografii.
5. POSTUP
- 5.1 Do zkumavky na 20 ml se převede 2 g (přibližně 2,2 ml) tukové látky, předem vysušené síranem sodným a přefiltrované. Přidá se 5 ml roztoku hydroxidu draselného a několik křemenných varných kamínků. Připojí se zpětný chladič a několik minut se zahřívá nad nízkým plamenem při současném protřepávání. Zmýdelňování je hotovo, jakmile je roztok čirý. Nakonec se zkumavka vychladí pod tekoucí vodou a zpětný chladič se odpojí.
- 5.2 Přidají se dvě kapky indikátoru a pomocí stříkačky pomalu 1 ml dimethylsulfátu. Zkumavka se hermeticky uzavře a dvě až tři minuty protřepe, přitom se v pravidelných intervalech ponořuje spodek zkumavky do vroucí vody. Reakce je dokončena, jakmile se barva indikátoru změní z modré na žlutou. Nakonec se zkumavka vychladí pod tekoucí vodou, pak se otevře a přidá se do ní 5 ml methanolového roztoku kyseliny chlorovodíkové.
- 5.3 Po několikasekundovém protřepávání se zkumavka odloží do nakloněného stojánku na zkumavky a lehkým poklepem se napomůže vystoupení methylesterů k povrchu ve formě olejovité hmoty (poznámka A).



Pomocí stříkačky dosahující až na dno zkumavky se odeberou methylestery, převedou se do zkumavky s kónickým dnem, přidá se oxid hlinitý o objemu přibližně jedné čtvrtiny objemu methylesterů, obsah zkumavky se protřepe a přefiltruje přes filtrační papír.

*Poznámka A* Pokud se methylestery okamžitě neoddělí, přidá se do zkumavky 5 ml vody a obsah zkumavky se protřepe.

### Metoda E

#### 2. PODSTATA

Analyzovaná tuková látka se ohřeje pod zpětným chladičem spolu se směsí methanolu, hexanu a kyseliny sírové. Získané methylestery se pak extrahují pomocí petroletheru.

#### 3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 3.1 Zkumavka přibližně na 20 ml se zábrusem, opatřená přibližně 1 m dlouhým vzduchovým zpětným chladičem.
- 3.2 Kalibrovaná pipeta na 5 ml.
- 3.3 Dělicí nálevka na 50 ml.
- 3.4 Odměrky na 10 ml a 25 ml.
- 3.5 Zkumavka s kónickým dnem na 15 ml.

#### 4. CHEMIKÁLIE

- 4.1 Methylační činidlo: bezvodá směs methanolu, hexanu a koncentrované kyseliny sírové ( $d = 1,84$ ) v poměru 75:25:1 (V/V/V).
- 4.2 Petrolether s bodem varu 40 až 60 °C.
- 4.3 Bezvodý síran sodný.

#### 5. POSTUP

- 5.1 Materiál odebraný z desky se vloží do zkumavky na 20 ml a přidá se 5 ml methylačního činidla.
- 5.2 Připojí se zpětný chladič a 30 minut se zahřívá ve vroucí vodní lázni (poznámka 2).
- 5.3 Směs s přídatkem 10 ml destilované vody a 10 ml petroletheru se kvantitativně převede do dělicí nálevky na 50 ml. Důkladně se protřepe a umožní se rozložení fází, odebere se vodná fáze a etherová vrstva se dvakrát propláchne 20 ml destilované vody. Do dělicí nálevky se přidá malé množství bezvodého síranu sodného, protřepe se, nechá několik minut usazovat a přefiltruje. Filtrát se přitom sbírá do zkumavky s kónickým dnem na 15 ml.

Rozpouštědlo se odpaří nad vodní lázni v proudě dusíku.

*Poznámka 1* Malá množství plynné kyseliny chlorovodíkové lze snadno připravit v laboratoři jednoduchým vytěsněním z roztoku obchodně dostupného ( $\rho = 1,18$ ) přikapáváním koncentrované kyseliny sírové ( $\rho = 1,84$ ). Uvolněný plyn se snadno vysuší probubláváním přes koncentrovanou kyselinu sírovou. Protože kyselina chlorovodíková se v methanolu velmi rychle absorbuje, je vhodné přijmout pro rozpouštění obvyklá preventivní opatření, tj. zavádět plyn přes malou převrácenou nálevku tak, aby se proud plynu právě dotýkal povrchu kapaliny. Předem lze připravit velká množství methanolového roztoku kyseliny chlorovodíkové, protože jej lze bezpečně uchovávat v lahvích uzavřených skleněnými zátkami uložených v temnu.

*Poznámka 2* V zájmu kontroly průběhu varu je nutno zasunout do zkumavky skleněnou tyčinku a teplotu vodní lázně udržovat na teplotě nejvýše 90 °C.

## 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.

## PŘÍLOHA XII

## ORGANOLEPTICKÉ HODNOCENÍ PANENSKÉHO OLIVOVÉHO OLEJE

## 1. PODSTATA

V této příloze se stanovují kritéria potřebná pro hodnocení chuťově-čichových počitků (flavour) panenského olivového oleje a popisuje se metodologie, použitá za tímto účelem.

## 2. OBLAST POUŽITÍ

Popsaný postup je použitelný pouze pro organoleptické hodnocení a klasifikaci panenského olivového oleje pro přímou spotřebu. Přitom se panenský olivový olej zařazuje na číselné stupnici podle sensorických podnětů, které panenský olivový olej vyvolá u skupiny vybraných posuzovatelů, z nichž se skládá zkušební komise.

## 3. OBECNÝ ZÁKLADNÍ SLOVNÍK PRO SENZORICKOU ANALÝZU

Viz kapitola s názvem „senzorická analýza — obecný základní slovník“.

## 4. SPECIFICKÝ SLOVNÍK PRO OLIVOVÝ OLEJ

*Svíravý, trpký*: charakteristický počitek u olivového oleje vyvolávající při degustaci v ústech svíravý pocit.

*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.

*Hořký*: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný ze zelených nebo nazelenalých oliv. Může být více či méně příjemný v závislosti na intenzitě.

*Hrubý*: charakteristický počitek vyvolaný některým olejem, který při ochutnávání způsobuje v ústech hustý, kašovitý pocit.

*Jablkový*: chuťově-čichový počitek u olivového oleje připomínající jablka.

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

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

*Mandlový*: připomínající chuťově-čichový počitek jak čerstvých mandlí, tak suchých zdravých mandlí, což může být zaměněno s počínajícím žluknutím. Při kontaktu s jazykem a patrem je možné to vnímat jako pachut; připomíná nasládlé olivové oleje s mdlým buketem.

*Mdlý nebo hladký*: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej s velmi slabými organoleptickými vlastnostmi v důsledku ztráty aromatických složek.

*Mýdlový*: vjem připomínající chuťově-čichový počitek typický pro zelené (jablkové) mýdlo.

*Nahořklý (po zelených listech)*: chuťově-čichový počitek u olivového oleje způsobené příliš zelenými olivami nebo vylisovanými listy a stonky.

*Olejový*: pach typický pro olivový olej získaný v lisovně olejů, ve které nebyly ze strojů řádně odstraněny zbytky nafty, mazacích tuků a minerálních olejů.

*Ovocný*: chuťově-čichový počitek u olivového oleje připomínající zdravé, čerstvé a zralé ovoce.

*Po kalném sedimentu*: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný dekantací ze sedliny z kádí a podzemních nádrží.

*Po lisovací rohoži*: chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný z oliv lisovaných ve špinavých lisovacích rohožích s pozůstatky fermentačního rezidua.

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

*Po plísňích a vlhkosti:* chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný z plodů, z nichž velké množství bylo napadeno plísněmi a kvasinkami v důsledku několikaletného uskladnění na hromádách ve vlhku.

*Po pokrutinách:* chuťově-čichový počitek u olivového oleje připomínající olivové pokrutiny.

*Po seně:* chuťově-čichový počitek u olivového oleje připomínající více či méně usušenou travu.

*Po štávě z plodů:* chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej špatně dekantovaný a který byl v dlouhodobém kontaktu se štávou z plodů.

*Po vyzrálých plodech:* chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný ze zralých plodů vyznačující se obvykle poněkud mdlou vůní a sladkou chutí.

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

*Sladký:* příjemná chuť, ne úplně cukrová, ale zjišťovaná u olivového oleje, u něhož nepřevažují hořké, štiplavé a čpavé charakteristiky.

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

*Starý:* chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej příliš dlouho skladovaný ve skladovacích obalech. Může se rovněž objevit u olivového oleje stočeného do obalů po příliš dlouhou dobu.

*Trávný:* chuťově-čichový počitek u olivového oleje připomínající čerstvě posečenou travu.

*Vinný, octový:* chuťově-čichový počitek u olivového oleje připomínající víno nebo vinný ocet. Vzniká hlavně v důsledku tvorby kyseliny octové, ethylacetátu a ethanolu ve větších množstvích, než jaká jsou v aroma olivového oleje obvyklá.

*Zatuchlý („atrojado“):* aroma typické pro olivový olej získaný z oliv skladovaných na hromádách, kde plody prošly pokročilým stupněm fermentace.

*Zemitý:* chuťově-čichový počitek typický pro olivový olej získaný z oliv sklizených s nánosem zeminy nebo bláta a neopraných. Může být někdy doprovázeno chutí a vůní připomínající plíseň a vlhkost.

*Žluklý:* chuťově-čichový počitek typický pro všechny oleje a tuky, které prodělaly proces autooxidace v důsledku dlouhodobého kontaktu se vzduchem. Je nežádoucí a nelze jej odstranit.

## 5. SKLENĚNÉ NÁDOBKY PRO HODNOCENÍ OLIVOVÉHO OLEJE

Viz kapitola s názvem „skleněné nádoby pro hodnocení olivového oleje“.

## 6. ZKUŠEBNÍ MÍSTNOST

Viz kapitola s názvem „návod na zřízení zkušební místnosti“.

## 7. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Všechny kabiny se vybaví dále uvedeným zařízením, nezbytně nutným pro posuzovatele pro řádné splnění svého úkolu a snadno dosažitelným:

- skleněné nádoby (normalizované) obsahující vzorky označené podle náhodného klíče dvojicí čísel, nebo čísel a písmenem. Tato označení se provedou nesmazatelným pachuprostým popisovačem;
- hodinová skla se shodným označením pro přikrytí skleněných nádobek;
- klasifikační arch (viz obrázek 2) obsahující návod k použití;
- tužka nebo pero;
- malé podnosy s nekrájenými jablky;
- skleněné nádoby s vodou o laboratorní teplotě.

## 8. POSTUP

Tento oddíl stanoví předběžné znalosti nutné k provedení senzoričké analýzy panenského olivového oleje a pokouší se standardizovat chování a postup posuzovatelů účastnících se takových zkoušek, kteří musí vzít na vědomí jak obecná, tak i specifická doporučení týkající se hodnocení olivového oleje.

### 8.1 Povinnosti předsedy zkušební komise (nebo předsedy skupiny posuzovatelů)

Předseda zkušební komise je příslušně vyškolená osoba, která má nezbytné odborné znalosti pro posuzování jednotlivých druhů olivových olejů. Je klíčovou postavou ve zkušební komisi a odpovídá za organizaci a řízení zkušebních činností. Svolává posuzovatele v dostatečném předstihu a podává jasné vysvětlení v případě jakýchkoli pochybností posuzovatelů ohledně provádění zkoušek, avšak zdrží se jakéhokoli vyjadřování svého mínění o vzorku.

Odpovídá za inventarizaci přístrojů a pomůcek a za jejich naprostou čistotu, za přípravu a kódové označení vzorků a jejich předkládání posuzovatelům v daném pořadí hodnocení, jakož i za sběr a statistické vyhodnocení zkušebních dat, s cílem získat výsledky na požadované úrovni s minimálním úsilím.

Práce předsedy zkušební komise vyžaduje vynikající schopnosti v oblasti senzoričké hodnocení, pečlivost při přípravě zkoušek a jejich striktní organizovaný průběh, jakož i zkušenost a trpělivost při plánování a provádění zkoušek. Úkolem předsedy zkušební komise je motivovat členy zkušební komise a podněcovat jejich zájem, zvědavost a soutěživost. Zdrží se vyjadřování svého mínění a musí zabezpečit, aby případné dominantní osobnosti neovlivňovaly ostatní posuzovatele. Odpovídá dále za odbornou přípravu, výběr a sledování posuzovatelů, aby se ubezpečil, že dosahují přiměřené úrovně výkonnosti.

### 8.2 Podmínky zkoušky

#### 8.2.1 Velikost vzorku

Každá skleněná nádobka obsahuje 15 ml oleje.

#### 8.2.2 Teplota přizkoušce

Vzorky olivového oleje připravené ke zkoušce se uchovávají v skleněných nádobkách při teplotě  $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Zvolená teplota umožňuje nejlépe zjišťovat organoleptické rozdíly při běžné teplotě, kdy jsou oleje používány jako přísady. Při vyšších nebo nižších teplotách se buď zřídka uvolňují aromatické složky nebo se vyskytují aromatické látky charakteristické pro zahřívání oleje.

#### 8.2.3 Doba zkoušek

Nejvhodnější dobou pro zkoušení olejů je dopoledne. Je dokázáno, že čichově-chuťové smysly jsou v průběhu dne zvláště citlivé.

Citlivost čichově-chuťových smyslů je před hlavním jídlem zvláště vysoká, zatímco po jídle slábne.

Toto kritérium však nesmí být přiváděno do extrému, aby posuzovatel nebyl rozptylován hladem a tím byla snížena jeho rozlišovací schopnost, zejména pokud jde o ovlivnění jeho prahu preference a akceptace.

## 9. POSUZOVATELÉ

Osoby působící jako posuzovatelé při organoleptických zkouškách jedlého olivového oleje se vyškolí a vyberou se podle jejich schopností rozlišovat mezi podobnými vzorky; je třeba vzít v úvahu, zda a nakolik se jejich posuzovací schopnost během odborné přípravy zlepší (viz příslušný odstavec).

Pro zkoušku je třeba 8 až 12 posuzovatelů, ačkoli je žádoucí mít několik rezervních posuzovatelů pro případ možných absencí.

### 9.1 Všeobecná doporučení týkající se kandidátů a posuzovatelů

Tato doporučení se týkají chování kandidátů a posuzovatelů během jejich práce.

Je-li posuzovatel vyzván předsedou zkušební komise k účasti na organoleptické zkoušce, musí být připraven dostavit se v stanoveném čase a přitom dodržet dále uvedená pravidla.

- 9.1.1 30 minut před stanoveným časem zkoušky je zakázáno kouření.
- 9.1.2 Není povoleno používání parfému, kosmetiky ani mýdla, jejichž pach by přetrval do doby zkoušky. Ruce je nutno si umývat neparfémovaným nebo slabě parfémovaným mýdlem a je třeba si je oplachovat a sušit tak často, jak je nezbytné pro odstranění jakéhokoli pachu.
- 9.1.3 Posuzovatel nesmí jíst po dobu nejméně jedné hodiny před započítáním zkoušky.
- 9.1.4 Pokud by se posuzovatel necítil fyzicky v pořádku, a zejména je-li ovlivněn jeho čichový nebo chuťový smysl, nebo pokud je pod psychickým tlakem, jenž by omezoval jeho schopnost koncentrace, sdělí toto předsedovi zkušební komise, aby jej tento mohl ze zkoušky uvolnit nebo přijmout náležitá opatření, přičemž je třeba vzít v úvahu také možnost odchylky od průměrných hodnot ostatních účastníků ve skupině.
- 9.1.5 Pokud posuzovatel splnil výše uvedené podmínky, zaujme své místo v přidělené kabině co nejspíšeji a co nejtíšeji.
- 9.1.6 Jakmile se usadí, zkontroluje, zda má správné a správně uspořádané přístroje a pomůcky a ujistí se, že označení na skleněné nádobce se shoduje s označením na hodinovém sklu.
- 9.1.7 Pozorně si přečte pokyny na klasifikačním archu a nezačne se zkoumáním vzorku, dokud si není absolutně jist úkolem, jenž má splnit. Případné pochybnosti si vyjasní mezi čtyřma očima s předsedou zkušební komise.
- 9.1.8 Posuzovatel uchopí nádobku, drží ji přitom zakrytou hodinovým sklem a mírně nakloněnou a zakrouží nádobkou jednou úplně tak, aby se vnitřní stěny co nejvíce navlhčily. Jakmile dokončí tuto etapu, sejme hodinové sklo a čichá ke vzorku plynulými, pomalými a hlubokými nádechy, dokud si nevytvoří úsudek o posuzovaném oleji. Čichání nebude trvat déle než 30 sekund. Pokud během této doby nedojde k závěru, před dalším pokusem si krátce odpočine. Po provedení čichové zkoušky posuzovatel posoudí chuť a vůni (flavour) (celkový čichově-chuťově-taktilní počitek). Proveďte to tak, že usrkne přibližně 3 ml oleje. Je velmi důležité rozprostřít olivový olej po celé dutině ústní, od přední části úst a jazyka, podél lícních stěn až k zadní části a části podepírající patro, protože vnímání základních chutí sladké, slané, kyselé a hořké se co do intenzity mění v závislosti na místě na jazyce a patře.

Je třeba zdůraznit, že pro posouzení je nebytné, aby se dostatečné množství olivového oleje velmi pomalu rozprostřelo na zadní části jazyka směrem ke krku, zatímco se posuzovatel soustřeďuje na pořadí, v němž se objeví hořký a štiplavý podnět; pokud se toto neprovede, oba tyto podněty mohou u některých olejů uniknout pozornosti nebo může být hořký podnět zastřen štiplavým podnětem.

Krátké opakované nádechy, při nichž je vzduch vtahován ústy, umožňují posuzovateli nejen rozsáhle rozšířit vzorek po celých ústech, ale též vnímat těkavé aromatické složky retronasální (pharyngonasální) metodou čichání.

V úvahu se též bere taktilní počitek. Následně je zaznamenána tekutost, lepivost a ostrost nebo palčivost, bude-li zjištěna, a pokud to zkouška vyžaduje, je kvantifikována intenzita těchto počitků.

- 9.1.9 Při organoleptickém hodnocení panenského olivového oleje je při každém sezení posouzen jeden vzorek, aby se předešlo kontrastnímu účinku, jenž by mohl nastat při okamžitém posouzení dalších vzorků.

Protože postupné posuzování způsobuje únavu nebo ztrátu citlivosti, je důležité použít něco, co může odstranit z úst zbytky olivového oleje z předchozího hodnocení.

Doporučuje se použít malý plátek jablka (přibližně 15 g), který je možné po rozžvýkání vyplivnout do plivátka. Poté se vypláchnou ústa malým množstvím vody o laboratorní teplotě. Mezi koncem jednoho hodnocení a začátkem dalšího musí uplynout nejméně 15 minut.

## 9.2 Prověření kandidátů

Tuto etapu skuteční předseda zkušební komise, jenž osobně pohovoří s kandidáty, aby se seznámil s jejich osobností a jejich zázemím. Fyziologické a psychologické podmínky, které musí být splněny, nejsou příliš přísné, protože účasti by teoreticky měla být schopna každá normální osoba. Faktory jako pohlaví, věk, zvláštní návyky (kouření) atd. jsou dnes zatlačovány do pozadí jinými, například zdravím, osobním zájmem a dostatkem času pro tuto práci.

Během rozhovoru předseda zkušební komise vysvětlí kandidátovi podrobnosti jeho úkolu a sdělí mu, kolik času úkol zabere. Poté získá od kandidáta údaje, které umožní posoudit jeho zájem a motivaci a zjistit, kolik času má k dispozici. Jako podkladový materiál je přitom možné použít dále uvedený dotazník.

## DOTAZNÍK

Odpovězte laskavě na tyto otázky:

- |  |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1. Chtěl(a) byste se spolupracovat na tomto úkolu  | Ano                      | Ne                       |
|  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Myslíte si, že by tento úkol je významný pro zlepšení kvality potravin ve Vaší zemi, jakož i v zahraničním obchodu?   | Ano                      | Ne                       |
|  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Pokud ano, proč <sup>(1)</sup> .....  |                          |                          |
| .....  |                          |                          |
| .....  |                          |                          |
| 4. V rámci své činnosti byste měl(a) degustovat olivový olej. Byl(a) byste na to připraven(a)?   | Ano                      | Ne                       |
|  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Chtěl(a) byste porovnat svou čichově-chuťovou citlivost se svými kolegy?  | Ano                      | Ne                       |
|  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Jste kdykoli k dispozici? Jste natolik nezávislý(á), abyste si mohl(a) zorganizovat svou denní práci podle svých potřeb?  | Ano                      | Ne                       |
|  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7. Jste-li závislý(á) na nadřízené(m), myslíte si, že by měl(a) pochopení pro Vaši nepřítomnost po dobu na pracovišti až 30 minut v průběhu několika po sobě jdoucích dnů? | Ano                      | Ne                       |
|  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8. Mohl(a) byste si ve svém zaměstnání napracovat čas strávený na senzorických analýzách?  | Ano                      | Ne                       |
|  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9. Myslíte, si že má být tato práce odměňována?  | Ano                      | Ne                       |
|  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10. Jakým způsobem?  | Ano                      | Ne                       |
|  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Předseda zkušební komise tyto informace použije při předběžném výběru kandidátů pro vyřazení těch, kteří jeví malý zájem o takovou činnost, nemají příliš času nebo nejsou s to formulovat své představy.

### 9.3 Stanovení „průměrného prahu“ skupiny pro „charakteristické vlastnosti“

Vyberou se čtyři oleje, které jsou typické pro charakteristické znaky „zatuchlý“ („atrojado“), „vinný, octový“, „žluklý“ a „hořký“ a co nejzřetelněji je reprezentují.

Odebere se alikvotní část každého olivového oleje a připraví se vzorky, z nichž každý má poloviční koncentraci než předchozí, postupným ředěním příslušným podkladem, dokud nebude zjištěn žádný rozdíl mezi skleněnou nádobkou obsahující pouze podklad a posledními dvěma nebo třemi roztoky. Poslední dvojici budou dvě skleněné nádobky s podkladem.

Série se doplní skleněnými nádobkami obsahujícími vyšší koncentrace do celkového počtu osmi.

Připraví se dostatečný počet vzorků s různými koncentracemi tak, aby každý kandidát dostal úplnou sadu každého znaku.

Pro stanovení „průměrného prahu“ kandidátů dostane každý z nich nádobku obsahující 15 ml jakékoli z připravených koncentrací a další nádobku obsahující pouze 15 ml podkladu. Po provedení zkoušky kandidát sdělí, zda jsou stejné či různé.

Stejná zkouška se opakuje se zbývajících koncentracemi posuzované vlastnosti.

Zaznamená se počet správných odpovědí získaných pro každou koncentraci ode všech posuzovatelů a uvede se jako procento z počtu provedených zkoušek.

<sup>(1)</sup> Odůvodněte, proč by se na potraviny, a zejména olivový olej, mělo vztahovat organoleptické hodnocení.

V grafu se zobrazí rostoucí zkoušené koncentrace jako nezávisle proměnná a procenta správných zjištění pro každou koncentraci jako závisle proměnná.

Obrázek 1 uvádí praktický příklad těchto pokynů. Jako práh detekce platí hodnota koncentrace, při které je uváděno 75 % správných zjištění. Práh detekce se stanoví extrapolací tohoto bodu ze závisle proměnné křivky správných zjištění.

Tato „prahová“ koncentrace, která se může lišit pro každý posuzovaný olivový olej podle intenzity určité vlastnosti, by měla být podobná u různých skupin kandidátů; nezávisí na zvyklostech, návycích nebo osobních preferencích, a proto představuje společný referenční bod společný pro každou skupinu běžných posuzovatelů a může být použit pro homogenizaci různých skupin posuzovatelů, pokud jde o čichově-chuťovou citlivost.

Na základě prahových koncentrací skupiny se dále postupuje takto:

Přípraví se série rostoucích a klesajících koncentrací tak, aby prahová koncentrace zaujímala na této stupnici 10. místo. Koncentrace na 11. a 12. pořadí jsou tedy více zředěné, takže je velmi těžké zjistit, zda obsahují olej s odpovídající vlastností.

Pokud se vychází z koncentrace  $C_{10}$ , je možné připravit ostatní koncentrace podle vzorce:

$C_{10} \times a^n$  kde  $a$  = konstanta pro koeficient ředění 1,5 a  $n$  = exponent o hodnotě 9 až - 2.

Příklad: Daná prahová hodnota pro žluklý olivový olej je 0,32. Při  $C_{10} = 0,32$  a  $a = 1,5$  pak existují dále uvedené koncentrace:

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

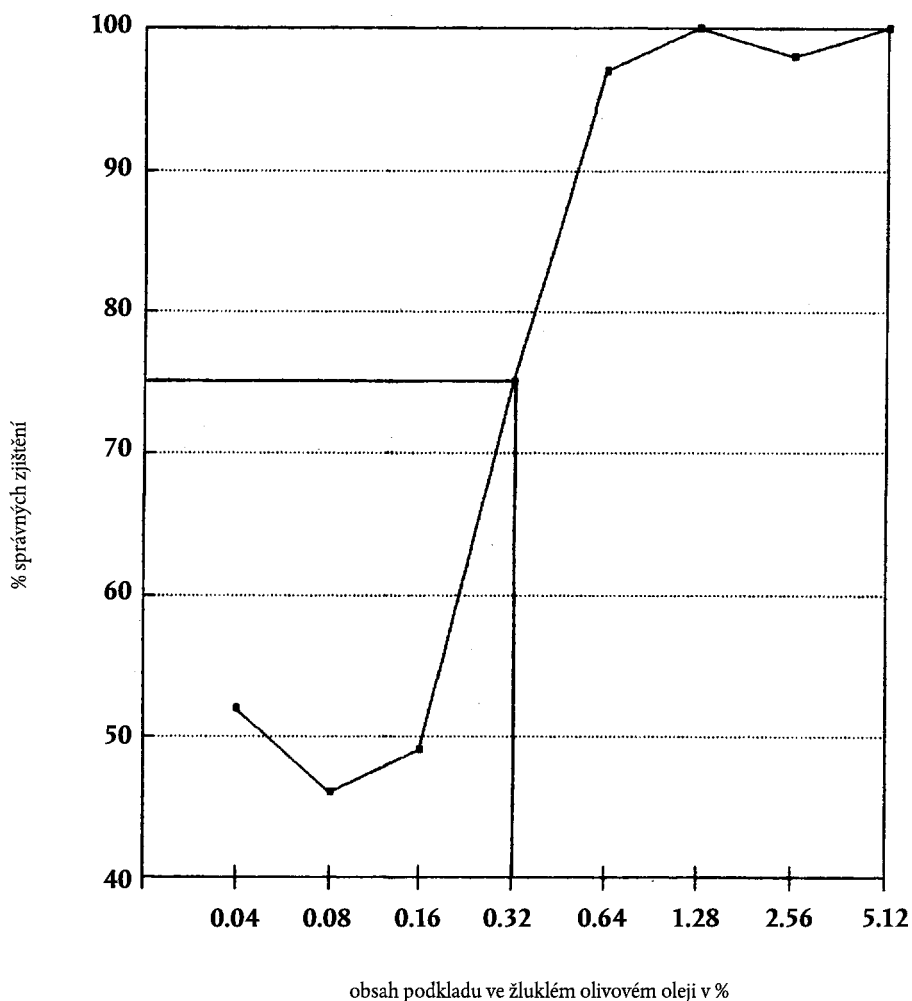
Pokud se tímto postupem a podle uvedeného vzorce připraví série koncentrací na základě daných prahových hodnot pro ostatní tři charakteristické znaky, budou k dispozici laboratorní stupnice se stejným odstupňováním jednotlivých podnětů pro každou vlastnost, i když vady použitých olivových olejů mohou být patrné s různou intenzitou.

#### 9.4 Výběr posuzovatelů metodou „klasifikace intenzity“

Pro výběr se připraví dvakrát až třikrát více kandidátů, než jich je třeba pro sestavení zkušební komise, aby bylo možné vybrat kandidáty s nejvyšší smyslovou citlivostí a rozlišovací schopností. Zkoušku je nutno provádět vždy se stejným výrobkem, jaký bude analyzován později (použije se vždy olivový olej).



Obrázek 1



Při výběru metody je třeba brát v úvahu vedle účinnosti také hospodárnost s ohledem na použité množství oleje, počet zkoušek a čas potřebný k výběru. Účinnost výběrové metody spočívá ve zvolení optimální úrovně těchto navzájem závislých proměnných: a) nákladů v závislosti na počet zkoušek, b) podílu potenciálně vhodných kandidátů, kteří se bohužel vyřadí a c) počtu nevhodných kandidátů, kteří náhodou prošli výběrovým procesem.

Pro výběr se použije metoda „klasifikace intenzity“ (intensity rating test) podle norem ASTM (American Society for Testing and Materials) a STP (Special Technical Publication) č. 440, str. 53, která byla změněna v těchto bodech:

1. snížení počtu vzorků ve zkušební sérii;
2. rozšíření rozsahu podnětů v zájmu zvýšení počtu čichově-chuťových poznámek při výběru, aby bylo možné brát v úvahu nejčastěji zjišťované vady olivového oleje;
3. obměňování koncentračních poměrů ve zkušební sérii;
4. statistické vyhodnocení výsledků.

#### Potřebné přístroje a pomůcky

- 1 500 ml láhve nebo skleněné baňky,
- zkušební nádoby z tmavě zbarveného skla,
- zkumavky se stupnicí, na 10 ml, 15 ml, 1 000 ml a 1 500 ml.

#### Potřebné výrobky

- parafin Merck (referenční č. 7 160, DAB 8, USP XX) nebo pachuprostý olejový podklad bez chuti (čerstvě rafinovaný olivový nebo jiný olej),
- olivové oleje: zatuchlý („atrojado“), vinný nebo octový, žluklý a hořký.

## 9.4.1 P o s t u p

Po přípravě roztoků přejděte do výběrové fáze začínající s 25 kandidáty, v souladu s dále uvedenou metodikou pro každý podnět:

1. Připravte sérii 12 zkušebních skleněných nádobek označených kódem (jednu sérii pro každého kandidáta). Do každé z daných zkušebních nádobek nalijte 15 ml každé z koncentrací připravených podle vzorce  $C_{10} \times a^n$ .
2. Po naplnění zkušebních nádobek je nechejte zakryté hodinovými skly v zkušební místnosti při teplotě 20 až 22 °C nejméně jednu hodinu před zahájením zkoušek, aby došlo k vyrovnání jejich teploty s teplotou okolí.
3. Předseda zkušební komise pak postaví 12 zkušebních nádobek z každé série do řady v sestupném pořadí koncentrace.

Na závěr se kandidáti požádají, aby individuálně provedli zkoušku; za tímto účelem se jim sdělí tyto pokyny:

## 9.4.2 Pokyny pro kandidáty

12 zkušebních nádobek vyrovnaných do řady před kandidátem obsahuje roztoky jakéhokoli z podnětů zatučhlý („atrojado“), vinný nebo octový, žluklý a hořký. Rozlišujícím faktorem mezi obsahy zkušebních nádobek je intenzita pachu, přičemž nádoby s nejsilnějším pachem stojí úplně vlevo a směrem doprava se koncentrace postupně snižují. Poslední zkušební nádoba umístěna vpravo může obsahovat tak málo aromatických látek, že je již není možné zjistit.

Postupujte takto: seznamte se s pachem každé zkušební nádoby v sérii. Přitom začněte na pravé straně (s nádobkou č. 12) a pokuste se vnímat intenzitu pachů, aniž byste příliš unavili své smysly.

Jakmile vnímáte celou škálu koncentrací pachů, opusťte zkušební místnost.

Mezitím předseda zkušební komise vyjme ze série jednu z zkušebních nádobek a umístí ji úplně vpravo, přičemž posune všechny zbývající tak, aby vyplnily prázdné místo. Poté se vrátíte do zkušební místnosti a pokračujete ve zkoušce.

Zkouška se skládá z těchto činností:

Zkušební nádobku vyjmutou z řady je nutno vrátit na její místo. Za tímto účelem proveďte libovolně početné pachové srovnání, přičemž je nutno si uvědomit, že aby byla nádoba umístěna správně, musí být její pach silnější než pach nádoby bezprostředně vpravo a slabší, než nádoby umístěné bezprostředně vlevo. Tato zkouška se opakuje se třemi dalšími nádobkami.

Pro usnadnění zkoušky a shromáždění odpovědí kandidáti obdrží spolu s uvedenými pokyny dále uvedený formulář.

## VÝBĚR KANDIDÁTŮ

Zkouška č. .... Vlastnost .....

Odebraná skleněná nádoba patří na pozici č. ....

Datum ..... Jméno .....

## 9.4.3 V ý s l e d k y

V zájmu přehlednosti výsledků zaznamenaná předseda zkušební komise údaje uvedené jednotlivými kandidáty takto:

Jméno kandidáta	Vlastnost	Zvolené místo (K')	Správné místo (K)	Vyhodnocení (K' - K) <sup>2</sup>
.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....

## 9.4.4 Statistické vyhodnocení odpovědí

V uvedeném případě jsou zkušební nádoby, které je třeba vrátit na jejich místo, pro všechny kandidáty stejné; podle statistických výpočtů se v tomto případě musí jednat o nádoby s pořadovými čísly uvedenými pro dané vlastnosti:

Zatuchlý („atrojado“) (Za)	vinný nebo octový (V)	žluklý (I)	hořký (Ho)
skleněná nádobka č. (10, 5, 7, 2)	skleněná nádobka č. (11, 3, 8, 6)	skleněná nádobka č. (7, 4, 10, 2)	skleněná nádobka č. (6, 3, 11, 9)

Odpovídající místa nádobek v řadě odpovídajících čísel se nesmí měnit, protože statistické výpočty jsou v tomto případě prováděny s ohledem na pravděpodobnost, se kterou se nádobky mohou náhodně zařadit na správné místo.

Aby si kandidáti nemohli mezi sebou vyměňovat informace, musí předseda zkušební komise dodržovat dále uvedená pravidla:

1. je třeba vyloučit výměnu informací mezi kandidáty. Pro každého kandidáta je třeba použít jiný kód;
2. je třeba vyloučit, aby kandidáti zjistili, které nádobky byly vyjmuty;
3. každému kandidátovi je třeba nádobky předkládat v jiném pořadí zkoušky.

Výsledky jednotlivých kandidátů se ohodnotí takto:

12 nádobek s odpovídajícími stupni koncentrace charakteristiky „i“ se označí sestupně podle daných koncentrací jako  $e^i_1, e^i_2, \dots, e^i_{12}$  („i“ = jedna z vlastností zatuchlý („atrojado“), vinný nebo octový, žluklý nebo hořký).

Nechť  $e^i_K$  je libovolná nádobka a  $K'$  poloha dané nádobky v řadě, určená kandidátem. Hodnoty  $K$  a  $K'$  jsou tudíž celá čísla 1 až 12 včetně, označující správné místo nádobky a místo, které nádobce v řadě přiřadil kandidát.

Nechť  $T$  (maximální přípustná odchylka) je předem daná hodnota, v našem případě 3, přijaté kritérium, že při  $(K' - K) > T$  je kandidát automaticky vyloučen <sup>(1)</sup>.

Jestliže naopak  $(K' - K) \leq T$ , kandidát v podstatě není vyloučen, ale může se dál účastnit zkoušky, protože je schopen vyjmutou nádobku vrátit na správné místo, minimálně na bezprostředně sousedící místo.

V tomto případě je ohodnocení kandidáta, jenž posoudil danou čichovou vlastnost (koncentraci) (např. zatuchlý („atrojado“)), rovno druhé mocnině rozdílu mezi správným místem v řadě nádobek a místem, na které kandidát nádobku umístil:

$$P^{Za}_h = (K' - K)^2.$$

Protože kandidáti jsou posuzováni na základě stupňů intenzity (stupňů ředění) jednotlivých vlastností, stanoví se individuální hodnocení pro danou vlastnost (např. zatuchlý („atrojado“) takto:

$$Z^{Za} = P^{Za}_h + P^{Za}_i + P^{Za}_1 + P^{Za}_m$$

Za účelem lepšího pochopení se uvádějí tyto příklady:

#### Příklad 1

Předpokládejme, že kandidát A odpověděl na otázky ohledně čtyřech stupňů intenzity ve zkušební řadě charakteristiky (i) takto:

Správné místo nádobky v řadě (K)	Zvolené místo (K')	Odchylka od správného místa (K' - K)
7	7	7-7 = 0
4	5	4-5 = -1
10	6	10-6 = 4 <sup>(1)</sup>
2	4	2-4 = -2

<sup>(1)</sup> Tento kandidát se vyřadí, protože při zkoušce dosáhl pouze hodnoty  $T > 3$ .

<sup>(1)</sup> Předseda zkušební komise musí působit na kandidáta, aby měl při provádění zkoušky na vědomí to, že by neměl ztrácet citlivost způsobenou únavou čichového smyslu.

Příklad 2:

Předpokládejme, že kandidát změní pořadí stupňů intenzity charakteristiky takto:

Správné místo nádoby v řadě (K)	Zvolené místo (K')	Odchylka od správného místa (K' - K)
7	7	7-7 = 0
4	4	4-5 = 0
10	7	10-7 = 3
2	3	2-3 = -1

Tento kandidát se nevyřadí. Získal toto hodnocení pro uvedenou vybranou vlastnost:

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

Celkové ohodnocení pro výběr nebo vyřazení kandidátů na základě jejich odpovědí ohledně čtyřech posuzovaných vlastností se provede takto:

$$P_h^{Za} + P_i^{Za} + P_l^{Za} + P_m^{Za} = Z^{Za}$$

$$P_h^V + P_i^V + P_l^V + P_m^V = Z^V$$

$$P_h^{Zl} + P_i^{Zl} + P_l^{Zl} + P_m^{Zl} = Z^{Zl}$$

$$P_h^{Ho} + P_i^{Ho} + P_l^{Ho} + P_m^{Ho} = Z^{Ho}$$

$$\underline{Z \text{ celkové} = Z^{Za} \dots Z^{Ho}}$$

kde  $Za$  = zatuchlý („atrojado“)

$V$  = vinný nebo octový

$Zl$  = žluklý

$Ho$  = hořký

Nyní je otázkou stanovit, do jaké maximální hodnoty  $Z$  se má za to, že kandidát má smyslovou citlivost, čichovou paměť a rozlišovací schopnost v měřítku potřebném pro správné posuzování čtyřech vlastností. Hodnota  $Z$  je podle definice vždy kladná a  $Z = 0$  znamená, že kandidát rozpoznal a správně zařadil všech 16 stupňů intenzity (čtyři pro každou vlastnost). Hodnoty  $Z$  různé od nuly znamenají, že kandidát sice rozpoznal místo, na které dané intenzity patří, avšak nebyl schopen určit přesné místo, protože nemá dobré rozlišovací schopnosti, pokud jde o řadu intenzit, která mu byla u jedné nebo více vlastností předložena.

Je proto třeba stanovit kritickou hodnotu  $Z_c$  tak, že kdyby kandidát náhodně vyměnil všechny nádoby uvnitř oblasti, kterou prve rozpoznal, pravděpodobnost konečné klasifikace  $Z < Z_c$  je dostatečně malá hodnota ( $\alpha$ ), kterou je možné určit předem. Jinými slovy musí být zajištěno, že pravděpodobnost, že tímto postupem se do zkušební komise vybere posuzovatel neprokazující dostatečnou rozlišovací schopnost ohledně intenzit vybraných vlastností, je nižší než  $\alpha$ .

Je-li stanovena hodnota  $\alpha$  (v našem případě 0,05), hodnota  $Z_c$  se získá z pravděpodobnostního distribuce proměnné  $Z$ , která zase závisí na pravděpodobnostní distribuci proměnné  $P(K)$ .

Po provedení příslušných statistických výpočtů se hodnota  $Z_c$  stanoví na 34.

Jakmile se stanoví hodnota  $Z$  pro všechny kandidáty, vyřadí se všichni s hodnotou vyšší než 34.

Kandidáti A a B tak obdrží tato ohodnocení:

Vlastnost	Kandidát A	Kandidát B
Zatuchlý („atrojado“) ( $Za$ )	$Z^{Za} = 10$	$Z^{Za} = 12$
Vinný nebo octový ( $V$ )	$Z^V = 10$	$Z^V = 11$
Žluklý ( $Zl$ )	$Z^{Zl} = 10$	$Z^{Ho} = 15$
Hořký ( $Ho$ )	$Z^{Ho} = 4$	$Z^{Ho} = 0$
	$\Sigma = 34$	$\Sigma = 38$

Kandidáti A a B dosáhli 34 respektive 38 bodů; v důsledku toho kandidát A ve zkoušce obstál, avšak B ne a vyřazuje se. Po vyřazení kandidátů s více než 34 body se ostatní zařadí podle dosažených bodů na listinu vhodných kandidátů a vybere se dvanáct nejlepších.

### 9.5 Odborná příprava

Hlavní cíle fáze odborné přípravy jsou tyto:

- a) posuzovatelé by si měli osvojit různé čichově-chuťově-taktilní varianty, které je možno nalézt v panenském olivovém oleji,
- b) posuzovatelé by měli znát specifické senzorycké metody,
- c) odborná příprava by měla zlepšit individuální schopnosti při zjišťování, identifikaci a kvantitativním stanovení senzoryckých charakteristik,
- d) měla by se zlepšit senzorycká citlivost a paměť ohledně různých vlastností v zájmu dosažení přesné a konsistentní úrovně hodnocení.

V závislosti na možnostech zkušební komise a účastníků představuje fáze odborné přípravy výcvik v rámci několika zkoušek, při kterých posuzovatelé hodnotí individuálně oleje a na závěr rozebírají společně s předsedou zkušební komise případné problémy a stanovují způsoby hodnocení v zájmu sjednocení kritérií a názorů.

Úroveň dosaženou v rámci odborné přípravy je možno hodnotit podle zvýšení procentního podílu správných hodnocení při rozlišovacích zkouškách nebo na základě analýzy odchylky průměrných individuálních hodnocení skupiny při zkouškách používajících stupnici.

Praktický význam období odborné přípravy byl rozsáhle diskutován, avšak v současnosti se pokládá za velmi účinný a důležitý nástroj, pokud mají být získána pravdivá a přesná senzorycká data.

### 9.6 Kontrola výkonnosti

Zkušební komise sestavené ze zkušených posuzovatelů běžně provádějí hodnocení pravidelně a opakovaně, přičemž jde o senzorycké zkoušky, které vyžadují z jejich strany velké úsilí. Ve velké většině případů na jejich posouzení závisí rozhodnutí s velkým technologickým i obchodním významem. Z tohoto důvodu musí být po výběru a odborné přípravě kontrolována výkonnost posuzovatelů, aby bylo zajištěno, že jejich výsledky jsou přesné.

Za tímto účelem musí posuzovatelé účastníci se rutinních zkoušek prokazovat pravidelně v určitých intervalech svou výkonnost.

## 10. POSTUP ORGANOLEPTICKÉHO HODNOCENÍ PANENSKÉHO OLIVOVÉHO OLEJE

Po splnění podmínek a přípravě nezbytných pomůcek podle příslušných norem, jakož i po výběru skupiny posuzovatelů, každý posuzovatel uchopí nádobku připravenou se zkušebním vzorkem olivového oleje za účelem čichového a chuťového hodnocení <sup>(1)</sup>; přitom posuzuje čichové, chuťové, taktilní a kinestetické vlastnosti podle klasifikačního archu uvedeného na obr. 2, ve kterém zaznamená existenci a intenzitu vlastností. Poté vyhodnotí kvalitu oleje.

### 10.1 Použití klasifikačního archu uvedeného na obr. 2 (popis vůně a chuti — flavour — a vyhodnocení kvality)

V levé polovině klasifikačního archu jsou uvedeny některé z charakteristických vlastností, které se u olivového oleje nejčastěji vyskytují a které jsou pro svou vůni a chuť (flavour) nejvýznamnější. Zjistí-li posuzovatel kromě toho další charakteristiky, uvede je s odpovídajícím popisem v rubrice „ostatní“.

Zjištěné charakteristiky se zakřížkují podle intenzity (+) v odpovídajícím políčku v souladu s dále uvedenou hodnotící tabulkou:

- 1: stěží vnímatelný,
- 2: slabý,
- 3: střední,
- 4: silný,
- 5: extrémní.

Pravá polovina tabulky obsahuje devítibodovou hodnotící tabulku (9 = výjimečná kvalita, 1 = nevyhovující), podle které posuzovatel provede jednotné celkové hodnocení vlastností oleje. Při tomto hodnocení je nutno brát v úvahu pozitivní znaky i vady, které již byly jednotlivě poznamenány v levé polovině.

<sup>(1)</sup> Může od toho výjimečně upustit, pokud v pachu zjistí extrémně nebo silně nepříjemnou vlastnost a tuto skutečnost zaznamená na klasifikační arch.

První sloupec hodnotící tabulky („Vady“) obsahuje pět rubrik, podle kterých se olivové oleje posuzují v podstatě na základě absolutní absence nebo větší či menší závadnosti chutí a pachů; protože má hodnotící tabulka devět bodů, je třeba brát v úvahu nuance a aspekty uvedené v druhém sloupci („Charakteristiky“), které rozhodujícím způsobem přispívají k celkovému hodnocení kvality.

## 10.2 Konečné hodnocení

Předseda zkušební komise shromáždí klasifikační archy předané jednotlivými posuzovateli a zkontroluje, zda zjištěné charakteristické znaky a intenzity, uvedené v profilovém listu odpovídají hodnocení olivového oleje, zanesenému v klasifikačním archu. Existují-li významné rozdíly, předseda zkušební komise vyzve posuzovatele, aby svůj klasifikační arch zkontroloval.

V případě nutnosti posuzovatel zkoušku zopakuje.

Nakonec předseda zkušební komise sestaví tabulku hodnocení celé skupiny a vypočítá aritmetický průměr a chybu (průměrné hodnoty).

Pouze v případě revizních analýz skupina zopakuje zkoušky, dokud nejsou k dispozici tři hodnocení každého vzorku; konečné hodnocení je střední hodnota ze tří hodnocení, přičemž výsledek se stanoví s přesností na jedno desetinné místo.

Je-li střední hodnota intenzity hořké a/nebo štiplavé (dráždivé) charakteristiky vyšší než 2,5, uvede se o oleje odpovídající hodnocení, přičemž se provede dodatečná poznámka, že olej je výjimečně hořký a/nebo štiplavý (dráždivý).

*Vyjádření výsledků:* na základě střední hodnoty stanoví předseda zkušební komise kategorii, do níž vzorek zařadí v souladu s prahovými hodnotami uvedenými v příloze I. Protokol o zkoušce uvede pouze tuto kategorii.

*Poznámka:* vzorky musí být uzavřeny v ledničce, dokud nebudou analyzovány, a po každé analýze vráceny do ledničky, dokud není provedena třetí zkouška.

**Obrázek 2**  
**Panenský olivový olej**

Profilový list  
Čichové, chuťové a taktilní vlastnosti

Charakteristiky	Intenzita (²)					
	0	1	2	3	4	5
Ovocný po olivách (zralý a nezralý) (¹)						
Jablkový.....						
Jiné zralé ovoce .....						
Nezralý (listy, tráva).....						
Hořký.....						
Štiplavý (dráždivý).....						
Sladký.....						
Jiné přípustné vlastnosti .....						
(specifikujte .....						
.....)						
Nakyslý/vinný/octový/kyselý (¹).....						
Hrubý.....						
Kovový.....						
Plesnivý/vlhký (¹) .....						
Kalný sediment .....						
Zatuchlý („atrojado“).....						
Žluklý.....						
Jiné nepřípustné znaky.....						
(specifikujte .....						
.....)						

(¹) Nehodící se škrtněte.

(²) Intenzita:

- 1: stěží vnímatelný,
- 2: slabý,
- 3: střední,
- 4: silný,
- 5: extrémní.

Klasifikační tabulka

Vady	Charakteristiky	Celková známka
Žádné	Ovocný po olivách	9
	Ovocný po olivách a po jiném čerstvém ovoci	8
		7
Slabé a stěží vnímatelné	Slabá ovocná chuť a vůně jakéhokoli typu	6
Vnímatelné	Spíše nedokonalá ovocná chuť a vůně, neobvyklé pachy a chutě	5
Významné, na hranici přijatelnosti	Zřetelně nedokonalé nepříjemné pachy a chuti	4
Silné a/nebo závažné, jasně vnímatelné		3
	Pachy a chuti naprosto nepřijatelné pro spotřebu	2
		1

Poznámky: .....

Jméno posuzovatele .....

Označení vzorku: .....

Datum: .....

## SENZORICKÁ ANALÝZA — SLOVNÍK

## 1. PŘEDMĚT

Tato norma uvádí seznam termínů a jejich definic, týkajících se sensorické analýzy.

## 2. SLOVNÍK

2.1 **Všeobecná terminologie**

*Senzorická analýza* (substantivum):

Zkoušení organoleptických vlastností výrobku smyslovými orgány.

*Vnímání* (substantivum):

Uvědomování si účinků jednotlivých nebo vícenásobných sensorických podnětů.

*Organoleptický* (adjektivum) (vlastnost):

Vztahující se k vlastnosti výrobku vnímatelné smyslovými orgány.

*Expert* (substantivum):

(pokud jde o zkoušení organoleptických vlastností)

Degustátor specializovaný na sensorickou analýzu konkrétního výrobku, který má základní znalosti o jeho výrobě a tržních preferencích.

*Degustátor* (substantivum):

Vybraný posuzovatel s vysokým stupněm sensorické citlivosti a zkušeností se sensorickou metodologií, schopný provádět sensorické hodnocení organoleptických vlastností potravinářského výrobku.

*Zkušební komise* (substantivum):

Skupina speciálně vybraných a vyškolených posuzovatelů, která se schází za účelem provedení sensorické analýzy výrobku za kontrolovaných podmínek.

*Počitek* (substantivum):

Subjektivní reakce vyplývající ze sensorického dráždění. Tato reakce je s ohledem na svou povahu, druh hodnocení a intenzitu subjektivně rozlišitelná a objektivně popsatelná prostřednictvím daných smyslových orgánů.

*Citlivost* (substantivum):

Schopnost vnímat, identifikovat a/nebo rozlišovat kvalitativně či kvantitativně pomocí smyslů jeden nebo více podnětů malé intenzity nebo malých rozdílů mezi takovými podněty.

*Degustace (ochutnávání)* (substantivum):

Činnost, která zahrnuje vnímání, analýzu a posouzení organoleptických vlastností výrobku, zejména čichových, chuťových, taktilních a kinestetických vlastností potravinářského výrobku.

*Akceptace* (substantivum):

Zjištění daného jedince nebo populace, že výrobek uspokojuje jejich očekávání.

*Harmonie* (substantivum):

Vlastnost výrobku, jež vyvolává celkově příjemný počitek. Tento počitek vzniká vnímáním složek výrobku jako čichových, chuťových, taktilních a kinestetických podnětů, které jsou přítomny ve vhodných poměrech koncentrace.

*Přijatelnost* (substantivum):

Stav výrobku příznivě přijímaného daným jedincem nebo populací v důsledku jeho organoleptických vlastností.

*Diskriminace* (substantivum):

Kvalitativní a/nebo kvantitativní rozlišení mezi dvěma nebo více podněty.

*Kompenzace* (substantivum):

Výsledek vzájemného působení více podnětů takového druhu, při němž je každý z nich vnímán s menší intenzitou, než kdyby působil samostatně.



*Aspekt* (substantivum):

Všechny viditelné vlastnosti látky nebo předmětu: velikost, tvar, barva, uspořádání částic, zákal, čistota, tekutost, zpěnění a perlivost. Tomuto termínu je nutno dávat přednost před termínem *vzhled*.

*Vlastnost* (substantivum)

Vnímání charakteristika.

## 2.2 Fyziologické termíny

*Podnět* (stimul) (substantivum):

Fyzikálně nebo chemicky popsatelný jev, který může podráždit vnější nebo vnitřní smyslové receptory.

*Chuť* (substantivum):

(chuťový smysl)

Smysl, jehož receptory jsou umístěny v ústech, zejména na jazyku, a které jsou aktivovány různými složkami roztoku.

*Chuťový* (adjektivum):

Popisuje vlastnost výrobku, jenž může podráždit chuťový aparát probuzením počitků náležejících k jedné nebo více ze čtyř hlavních chutí: sladké, slané, kyselé a hořké.

*Receptor* (substantivum):

Specifická struktura smyslového orgánu, která může být podrážděna a je schopna přijímat podněty a dále je převádět na nervový vzruch.

*Poznámka:* receptory se rozlišují podle typu energie spojené s podnětem (světlo, teplo, zvuk atd.).

*Čich* (substantivum):

Funkce čichového ústrojí spočívající ve vnímání a rozlišování mezi molekulami, které se k němu dostanou nosem přímo nebo nepřímo v plynném stavu z vnějšího prostředí.

*Intenzita* (substantivum):

Velikost energie měřitelné vlastnosti nad určitým prahem pomocí kvantitativně vyjádřené stupnice hodnot.

*Adaptace* (substantivum):

Dočasná modifikace citlivosti při vnímání sensorického podnětu vzhledem k pokračujícímu a/nebo opakovanému vystavení se danému podnětu nebo podnětu, který se mu podobá.

*Potlačení* (substantivum):

Chybějící odezva smyslového orgánu nebo jeho části, přestože je vystaven působení vhodného podnětu, jehož intenzita je nad prahem vnímání.

*Odezva* (substantivum):

Činnost, kterou smyslové buňky reagují na působení jednoho nebo více podnětů ve vztahu k danému smyslovému orgánu.

*Tělo* (substantivum):

Taktilní počitek vnímaný v ústech, poskytující informaci o stupni hustoty, viskozity, konsistence nebo kompaktnosti látky.

*Vůně* (substantivum):

Čerstvý, příjemný a lahodný pach.

*Čichat* (verbum):

(aktivně používat čichový smysl)

Vnímat nebo pokoušet se vnímat pach.

*Objektivní* (adjektivum):

- označení pro sdělení pravdivé a ověřitelné informace shodující se se skutečností s minimalizováním lidského faktoru (například preference, zvyky, sklony);
- označení pro techniku, která prostřednictvím sensorických nebo instrumentálních metod minimalizuje samovolně vznikající chyby.

*Poznámka:* používat termín „instrumentální“ jako synonymum se nedoporučuje.

*Subjektivní* (adjektivum):

Označení pro sdělení dojmu, který je vyvolán nejen podnětem, ale také našimi osobně zaujatými myšlenkami a pocity.

*Kinestezie:*

Počitky vznikající z tlaku na vzorek, vyvolané pohybem svalstva v dutině ústní nebo prsty (například zkoušení sýra tlakem prstů).

*Práh (substantivum):*

*Absolutní práh:*

Nejmenší hodnota senzorického podnětu:

- potřebná k vyvolání počitku (podnětový práh nebo práh detekce), nebo
- při které lze vnímaný počitek identifikovat (práh rozpoznání).

*Rozdílový práh:*

Nejmenší hodnota senzorického podnětu potřebná k vyvolání vnímatelného rozdílu ve fyzikální intenzitě počitku.

*Práh nasycení (koncový práh):*

Největší hodnota intenzity senzorického podnětu, nad níž nelze vnímat rozdíl v intenzitě.

*Preferenční práh:*

Nejmenší kvantitativní hodnota senzorického podnětu nebo kritická nadprahová hodnota tohoto podnětu, který ve srovnání s neutrálním podnětem vyvolá příjemný nebo nepříjemný počitek, například při volbě mezi roztokem cukru a vodou.

*Poznámka:* je třeba rozlišovat mezi absolutním preferenčním prahem a rozdílovým preferenčním prahem.

*Podprahový (adjektivum):*

Vztahující se na podnět pod uvažovaným prahem.

*Nadprahový (adjektivum):*

Vztahující se na podnět nad uvažovaným prahem.

*Smyslová únava:*

Stav adaptace smyslů, při němž nastává pokles citlivosti.

*Kompenzace (substantivum):*

Výsledek takového vzájemného působení několika podnětů, při němž je každý z nich vnímán s menší intenzitou, než kdyby působil samostatně.

*Synergismus (substantivum):*

Spojený účinek dvou nebo více podnětů, jejichž kombinace vyvolává vyšší úroveň počitků, než lze očekávat od samostatných účinků jednotlivých podnětů.

*Kontrastní účinek:*

Nárůst odezvy na rozdíly mezi dvěma současnými nebo následnými podněty; opak konvergentního účinku.

*Konvergentní účinek:*

Snížení odezvy na rozdíly mezi dvěma současnými nebo následnými podněty; opak kontrastního účinku.

### 2.3 Terminologie vztahující se k organoleptickým vlastnostem

*Kyselý (adjektivum):*

- a) popisuje primární (základní) chuť vyvolanou vodnými roztoky většiny kyselých látek (např. kyseliny citronové, kyseliny mléčné, kyseliny vinné);
- b) popisuje organoleptickou vlastnost čistých látek nebo směsí, které vyvolávají kyselou chuť.

Odpovídající substantivum je kyselost.

*Nakyslý (adjektivum):*

Popisuje čichově-chuťový počitek, v němž převažují kyseliny obvykle vytvořené kvašením, jakož i potraviny, které vyvolávají tento počitek.

Některé faktory, které přispívají k tomuto počitku, se vztahují ke kvašení, např. mléčné nebo octové kvašení potravinářských výrobků.

*Hořký* (adjektivum):

- a) popisuje primární (základní) chuť tvořenou vodnými roztoky různých látek (např. chinin, kofein a některé alkaloidy),
- b) organoleptická vlastnost čistých látek nebo směsí, které vyvolávají hořkou chuť.

Odpovídající substantivum je hořkost.

*Slaný* (adjektivum):

- a) charakteristický chuťový počitek, jak jej typicky vyvolá roztok chloridu sodného;
- b) organoleptická vlastnost čistých látek nebo směsí, které vyvolávají slanou chuť.

Odpovídající substantivum je slanost.

*Sladký* (adjektivum):

- a) popisuje primární (základní) chuť vyvolanou vodnými roztoky přírodních nebo umělých látek, např. sacharosy;
- b) organoleptická vlastnost čistých látek nebo směsí, které vyvolávají sladkou chuť.

Odpovídající substantivum je sladkost.

*Svíravý, trpký* (adjektivum):

- a) popisuje komplexní počitek, doprovázený svíráním, stahováním a/nebo svrašťováním kůže nebo pokožky sliznice ústní dutiny vytvářený např. tříslovinou z káki a trnek;
- b) organoleptická vlastnost čistých látek nebo směsí, které vyvolávají svíravý počitek.

Odpovídající substantivum je svíravost (trpkost).

*Flavour (chuť a vůně)* (substantivum):

Termínem „flavour“ se označuje celkový sensorický dojem, vyvolaný kombinací čichových, chuťových, taktilních a kinestetických počitek, které jsou pro potravinářský výrobek charakteristické a které byly vyhodnoceny jako více či méně příznivé nebo nepříznivé.

*Chuť* (substantivum):

- a) počitky vnímané chuťovým orgánem drážděným určitými rozpustnými látkami;
- b) vlastnost výrobku vyvolávající počitky chuti.

*Primární (základní) chuť* (substantivum):

Kterákoliv z význačných chutí, mezi něž patří sladká, slaná, kyselá, hořká.

*Pach* (substantivum):

- a) kombinace počitek vnímaných čichovým orgánem při čichání daných těkavých látek;
- b) organoleptická vlastnost specifického počitku vyvolaného kteroukoli z výše uvedených látek.

*Vůně, aroma* (substantivum):

- a) příjemný počitek vnímaný v průběhu ochutnávání retronasální (pharyngonasální) metodou čichání;
- b) v souvislosti s parfumerií a v obecném jazyku se tento termín též používá pro stejný počitek vnímaný přímo nosem.

*Pachutí; zbytková chuť* (substantivum):

Kombinace počitek vnímaných po zmizení podnětu z úst, která se liší od počitek vnímaných předtím.

*Aromatický* (adjektivum):

- a) organoleptická vlastnost čistých látek nebo směsí, které při ochutnávání vyvolávají počitky známé jako aroma;
- b) popisuje látky, které při přímém zkoumání nosem vyvolávají počitky vůně a svěžesti.

*Textura* (substantivum):

Vlastnosti látky v pevném nebo rheologickém stavu, vnímatelné prostřednictvím mechanických receptorů během ochutnávání, zejména prostřednictvím receptorů umístěných v ústech.

*Poznámka:* tento termín se vztahuje výhradně k objektivním vlastnostem, nikoliv k vytvářeným počitkům, které jsou označeny obecnými termíny jako konzistence, vláknitost, mastnost atd.

*Převalování v ústech:*

Činnost, při níž se potravina dostává do styku se všemi oblastmi úst citlivými na chuťové počitky, takže je možné počitky vyvolané touto činností v ústech vnímat.

*Poznámka:* tento slovník může být rozšířen na základě konzultace norem ISO 5492 část I až V a jiných publikací, k nimž patří například publikace od J. L. Magnena s názvem „Les cahiers techniques du Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation“, atd.

## ZKUŠEBNÍ NÁDOBKY PRO HODNOCENÍ OLIVOVÉHO OLEJE

### 1. PODSTATA

Účelem této metody je popsat vlastnosti nádoby, která má být použita při organoleptických zkouškách jedlých olejů (pach, chuť, flavour).

Dále popisuje zařízení pro dosažení a udržování teploty vhodné pro zkoušky.

### 2. POPIS

Na obrázku 1 je zkušební nádoba, která má optimální vlastnosti vhodné pro tento účel:

- a) maximální možná stabilita bránící převrácení nádoby a rozlití oleje;
- b) základna, která snadno zapadá do prohlubni v ohřívacím zařízení, aby se dno skleněné nádoby rovnoměrně zahřívalo;
- c) tvar, který je nejširší u základny, aby se těkavé složky olivového oleje snadno uvolňovaly, který se zužuje u ústí, aby se tytéž složky koncentrovaly, čímž se zabezpečí jejich lepší vnímání a rozpoznávání nosem;
- d) tmavě zbarvené sklo, aby posuzovatel nerozeznal barvu oleje, čímž by mohl být ovlivněn a mohl by se nechat odvést od objektivního hodnocení.

#### 2.1 Rozměry

Skleněná nádoba vyobrazená na obrázku 1 má tyto rozměry:

— celkový objem.....	130 ml ± 10 ml,
— celková výška .....	60 mm ± 1 mm,
— průměr ústí .....	50 mm ± 1 mm,
— průměr v nejširší části .....	70 mm ± 1 mm,
— průměr základny.....	35 mm ± 1 mm,
— tloušťka stěny .....	1,5 mm ± 0,2 mm,
— tloušťka dna .....	5 mm ± 1 mm.

Každá skleněná nádoba je vybavena hodinovým sklem, jehož průměr je o 10 mm větší než ústí nádoby. Toto hodinové sklo je použito jako uzávěr bránící ztrátě aroma a vnikání prachu.

#### 2.2 Výrobní specifikace

Nádoba je vyrobena z odolného, tmavého skla, bez škrábanců a bublin, takže nelze rozeznat barvu obsahu.

Okraj je rovnoměrný, hladký a s obrubou.

Nádoba je z kaleného skla, aby vydržela teplotní změny, které se mohou vyskytnout při zkouškách.

### 2.3 Návod k použití

K čištění nádobek se použije pachuprosté mýdlo, případně mycí prostředek, a nakonec se propláchne dostatečným množstvím vody, aby se odstranily veškeré zbytky čistícího prostředku. Nakonec s propláchnu destilovanou vodou, nechá se odkapat a uschnout v elektrické sušárně.

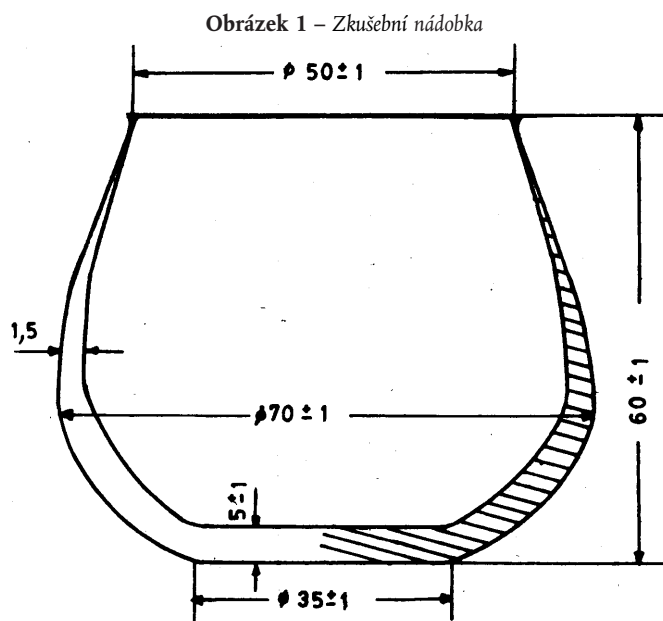
Nesmí se používat ani koncentrované kyseliny, ani směsi kyseliny se sloučeninami chromu.

Skleněné nádoby se uchovávají až do použití v elektrické sušárně nebo jiné skříně za účelem ochrany proti získání vnějších pachů.

Před každým použitím se nádobka zkontroluje očicháním, zda nemá vnější pachy. Při přípravě zkoušky je nutné pečlivě zaznamenat kód na každé skleněné nádobce a olej, který obsahuje. Pouze předseda zkušební komise může vědět, který kód odpovídá kterému vzorku oleje.

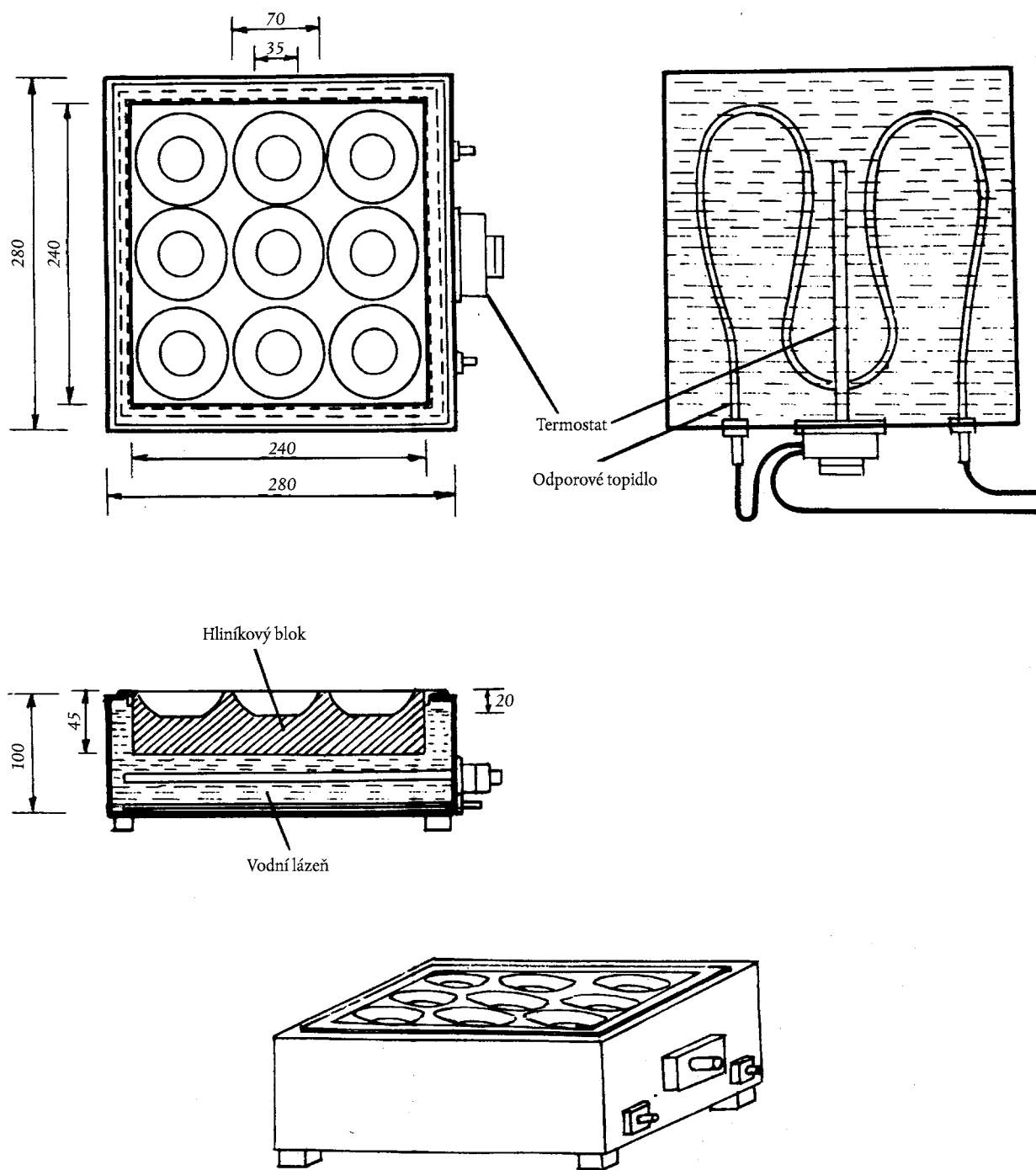
### 3. ZAŘÍZENÍ PRO OHŘÍVÁNÍ VZORKŮ

Organoleptické hodnocení vzorků je nutno provádět při stanovené hodnotě, která musí činit v případě jedlých olejů  $28 \pm 2$  °C. Za tímto účelem je v každé kabině v dosahu posuzovatele nainstalováno ohřívací zařízení (viz obrázek 2). Toto zařízení se skládá z hliníkového bloku ponořeného do vodní lázně s termostaticky regulovanou teplotou nastavenou na konstantní hodnotu. V tomto bloku je řada prohlubní, do nichž zapadají základny skleněných nádobek. Teplotní rozdíl mezi ohřívacím zařízením a olivovým olejem obsaženým v skleněných nádobkách vložených do prohlubní různých bloků může činit nejvýše  $\pm 2$  °C.



Rozměry (v mm)

Obrázek 2 – Zařízení pro ohřívání vzorků (rozměry v mm)



## NÁVOD NA ZAŘÍZENÍ ZKUŠEBNÍ MÍSTNOSTI

### 1. ÚVOD

Zkušební místnost je navržena tak, aby posuzovatelům, kteří se účastní na senzorických zkouškách, poskytla účelné, příjemné a standardizované pracovní prostředí, usnadňující práci a pomáhající dosažení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti výsledků.

### 2. PODSTATA

Tyto předpisy stanoví základní předpoklady pro zařízení zkušební místnosti.

### 3. VŠEOBECNÉ SPECIFIKACE ZAŘÍZENÍ

Místnost musí splňovat dále uvedené požadavky, bez ohledu na svou velikost (viz 3.1):

Místnost musí být příjemná a dobře osvětlená (viz 3.2), ale stylově neutrální. Pro tento účel se doporučuje uklidňující, lehká, jednobarevná malba na stěnách, aby se dosáhlo uvolněné atmosféry<sup>(1)</sup>.

Místnost má být taková, aby ji bylo možno jednoduše uklidit a nesmí být vystavena žádným zdrojům rušení; proto je třeba ji podle možnosti zvukově izolovat. Je třeba ji také chránit před vnikáním vnějších pachů a za tímto účelem se podle možnosti vybaví účinným ventilačním zařízením. V případě velkých výkyvů okolní teploty je zkušební místnost nutno vybavit klimatizací, která umožní stálou teplotu od 20 do 22 °C.

#### 3.1 Rozměry

Rozměry závisí velmi na možnostech laboratoří popřípadě společností. Obecně musí být dostatečně velké na to, aby umožnily instalaci deseti kabin a prostoru pro přípravu vzorků.

Přirozeně platí, že čím větší místnost, tím lépe, neboť je pak možné zařídit pomocné prostory, například pro čištění materiálů, přípravu jídla a společné schůze otevřených zkušebních komisí.

#### 3.2 Osvětlení

Celkové přirozené nebo umělé osvětlení (např. zářivkami) musí být rovnoměrné, pravidelné a rozptýlené.

#### 3.3 Teplota a vlhkost vzduchu

Místnost se musí udržovat na příjemné teplotě a vlhkosti vzduchu. Doporučuje se teplota 20 až 22 °C a relativní vlhkost vzduchu 60 až 70 %, s výjimkou zvláštních okolností.

### 4. POPIS KABIN

#### 4.1 Všeobecné charakteristiky

Kabiny pro senzorickou analýzu se v místnosti umístí vedle sebe, se stejným vybavením a oddělené dělicími přepážkami, aby sedící posuzovatelé neměli mezi sebou žádný kontakt.

Kabiny mohou být vyrobeny z vhodného materiálu, který se snadno čistí a udržuje (například dřevo, leštěná překližka, laminované desky atd.). Je-li použit nátěr, musí být po zaschnutí zcela bez zápachu.

Idle umístěné v kabinách musí být pohodlné a výškově nastavitelné.

Každá kabina je též vybavena individuálním osvětlením s nastavitelnou intenzitou a směrem.

Každá kabina by dále měla být vybavena tlačítkem spojeným s vnějším signalizačním světlem, umožňujícím posuzovateli bez rušení ostatních dát pomocníkovi nacházejícímu se mimo kabinu na vědomí, že ukončil zkoušku, požaduje další vzorky, chybí mu část přístrojů a pomůcek, zaznamenal nějakou neobvyklou událost nebo si přeje získat informace atd.

<sup>(1)</sup> Barva a osvětlení mohou ovlivnit výsledky senzorické analýzy.

#### 4.2 Rozměry

Kabiny musí být dostatečně rozměrné a pohodlné. Obecně se předpokládají tyto rozměry:

- šířka:
  - 0,75 m (bez výlevky)
  - 0,85 m (s výlevkou),
- hloubka:
  - 0,50 m (stůl)
  - 0,20 m (na dělicí přepážku),
- výška přepážek:
  - nejméně 0,60 m nad úroveň stolu,
- výška stolu:
  - 0,75 m.

#### 4.3 Uspořádání

Povrch stolu musí umožňovat snadné čištění.

Část této stolní desky je využita pro výlevku s tekoucí pitnou vodou. Není-li to však proveditelné, je možné tento prostor využít pro ták, plivátko nebo podobnou součást vybavení.

Pokud musí být vzorky během zkoušky udržovány na stálé teplotě, která je vyšší nebo nižší než teplota okolí, je vhodné mít pro tento účel vhodné zařízení (nádobu na vodní lázeň, varnou plotýnku atd.).

K dispozici též může být polička umístěná ve výšce přibližně 1,10 metru od podlahy pro odkládání různého příslušenství (skleněných nádobek, drobného nářadí atd.).

Umožňuje-li to uspořádání kabin v zkušební místnosti, je vhodné instalovat zařízení pro přípravu vzorků. Toto zařízení může mít formu posuvných dvířek (obrázek 1), otočného vertikálního zařízení (obrázek 2) vhodného pro skleněné nádoby nebo šálky (dlouhé kontejnery) nebo horizontálně se otevírajícího poklopu, pokud kontejnery, v nichž jsou uchovávány vzorky, jsou malé (obrázek 3). Jde prostě o to zajistit, aby otvor byl dostatečně velký na to, aby jím prošly tácy a skleněné nádoby obsahující vzorky.

Viz obrázek 4 s příkladem zkušební místnosti a doplňkových prostorů.

#### 5. VEDLEJŠÍ PROSTORY

Je-li dostatek místa, je třeba naplánovat samostatné prostory pro přípravu vzorků (kulinárních nebo jiných), přípravu skleněných nádobek nebo přístrojů a pomůcek a pro rozhovory před zkouškami nebo po nich. Takové prostory je nutno udržovat v čistotě a jakékoli pachy, hluk nebo konverzace z těchto prostorů nesmí žádným způsobem rušit práci posuzovatelů ve zkušební místnosti.

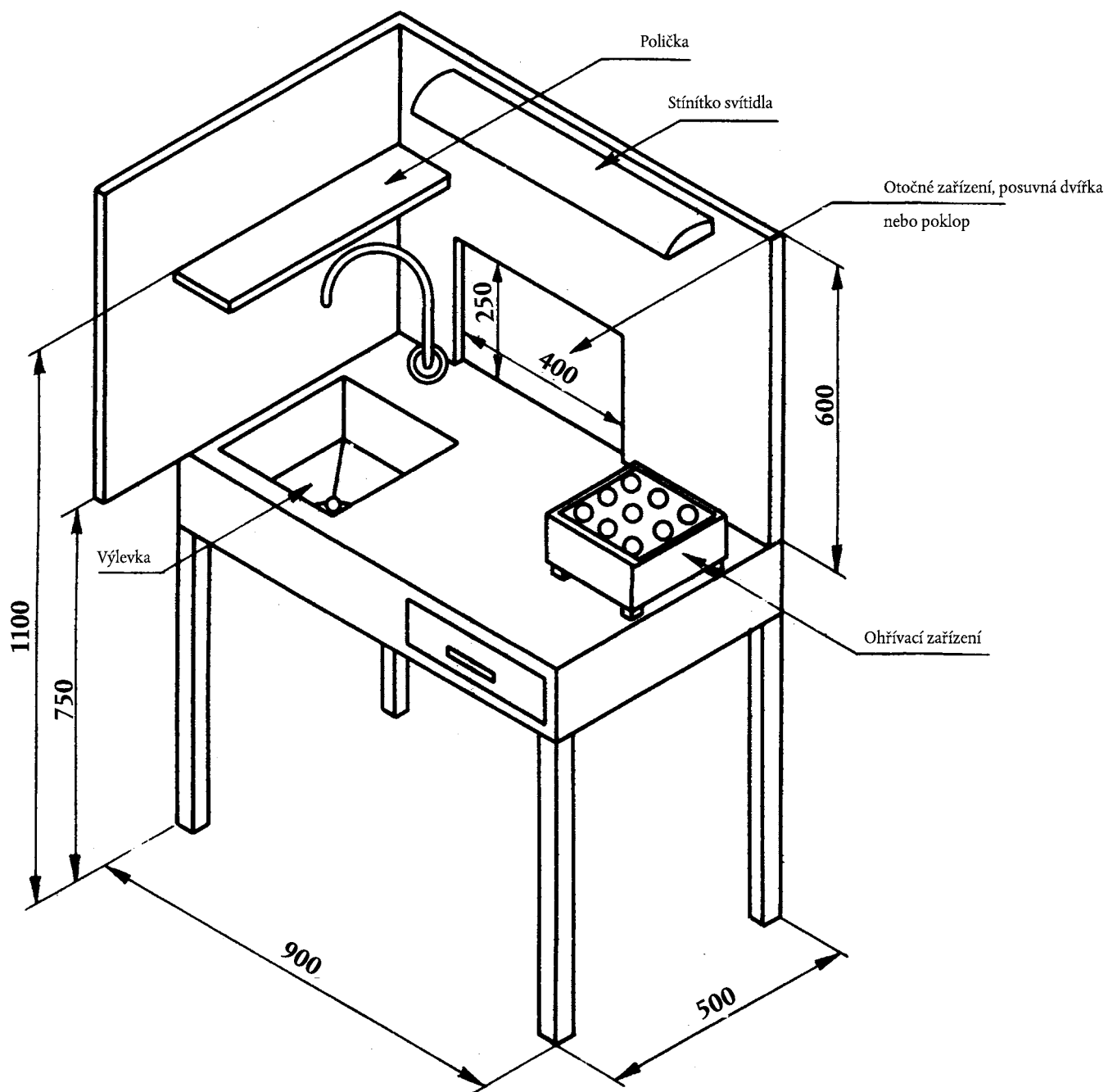
Obrázek 4 uvádí příklad zkušební místnosti s vedlejšími prostory.

*Poznámka:* U popsaných podmínek se jedná o ideální stav. Nebude-li však možné mít k dispozici takové zařízení výhradně pro senzorickou analýzu, zkoušky je možné provádět v prostorech vyhovujících minimálním uvedeným podmínkám (osvětlení, teplota, hluk, pachy) po instalaci přenosných kabin vyrobených ze skládacích prvků tak, aby minimálně oddělovaly posuzovatele navzájem.



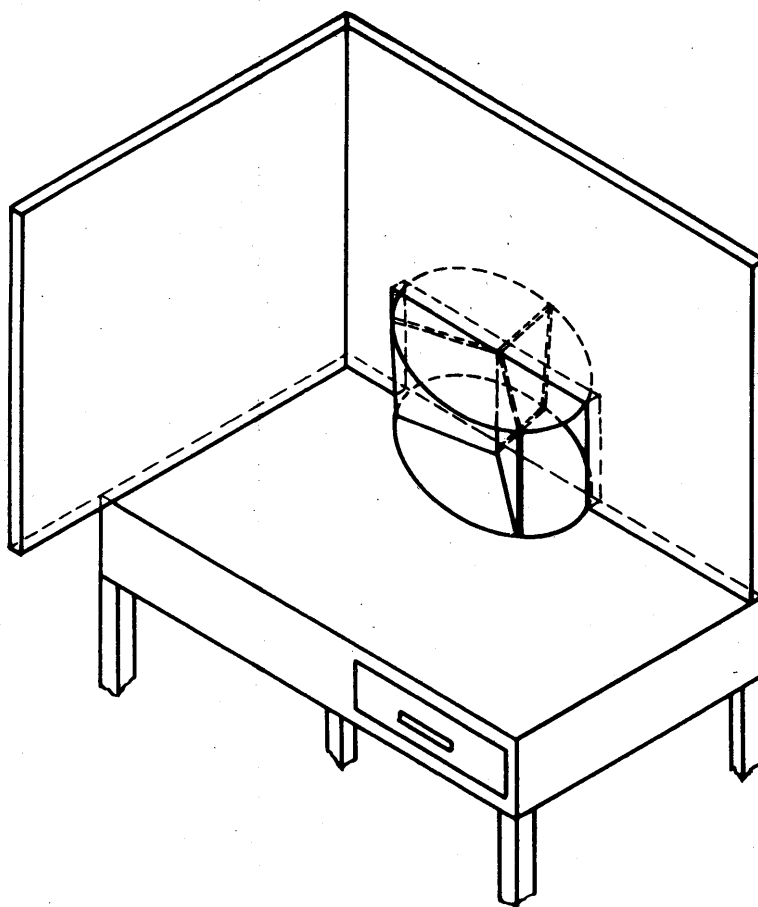
## USPOŘÁDÁNÍ KABINY

Obrázek 1



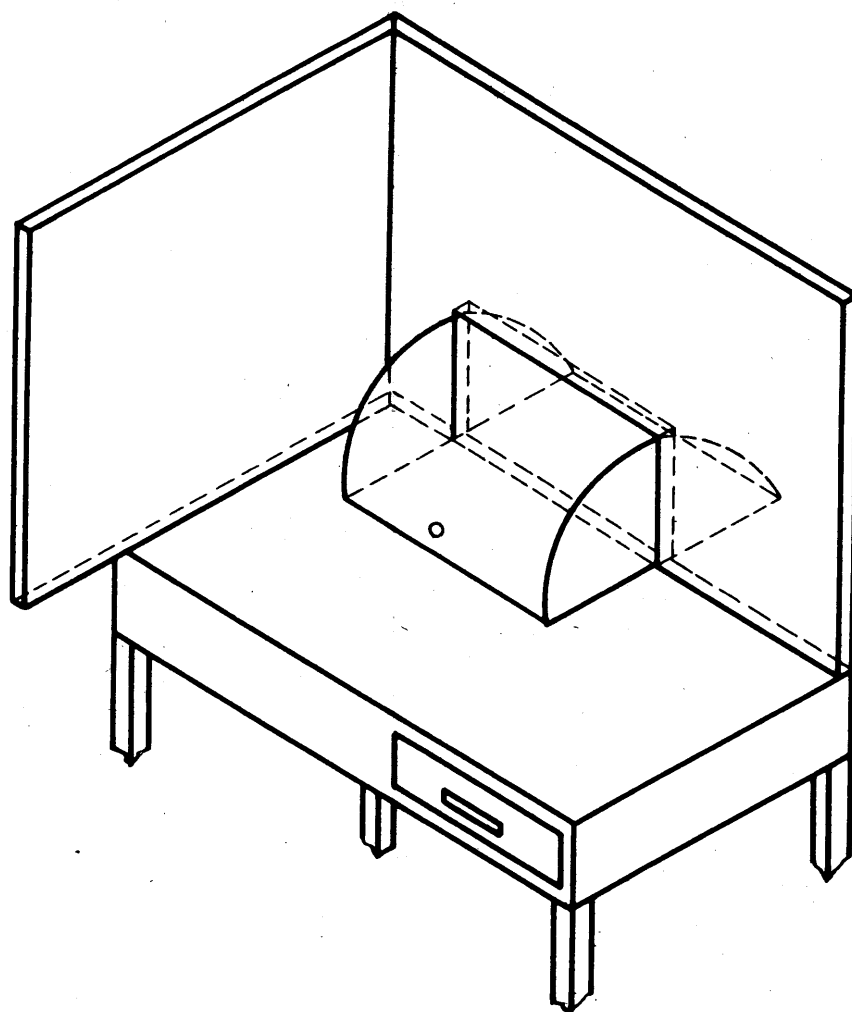
## OTOČNÉ VERTIKÁLNÍ ZAŘÍZENÍ PRO PŘEDKLÁDÁNÍ VZORKŮ

Obrázek 2



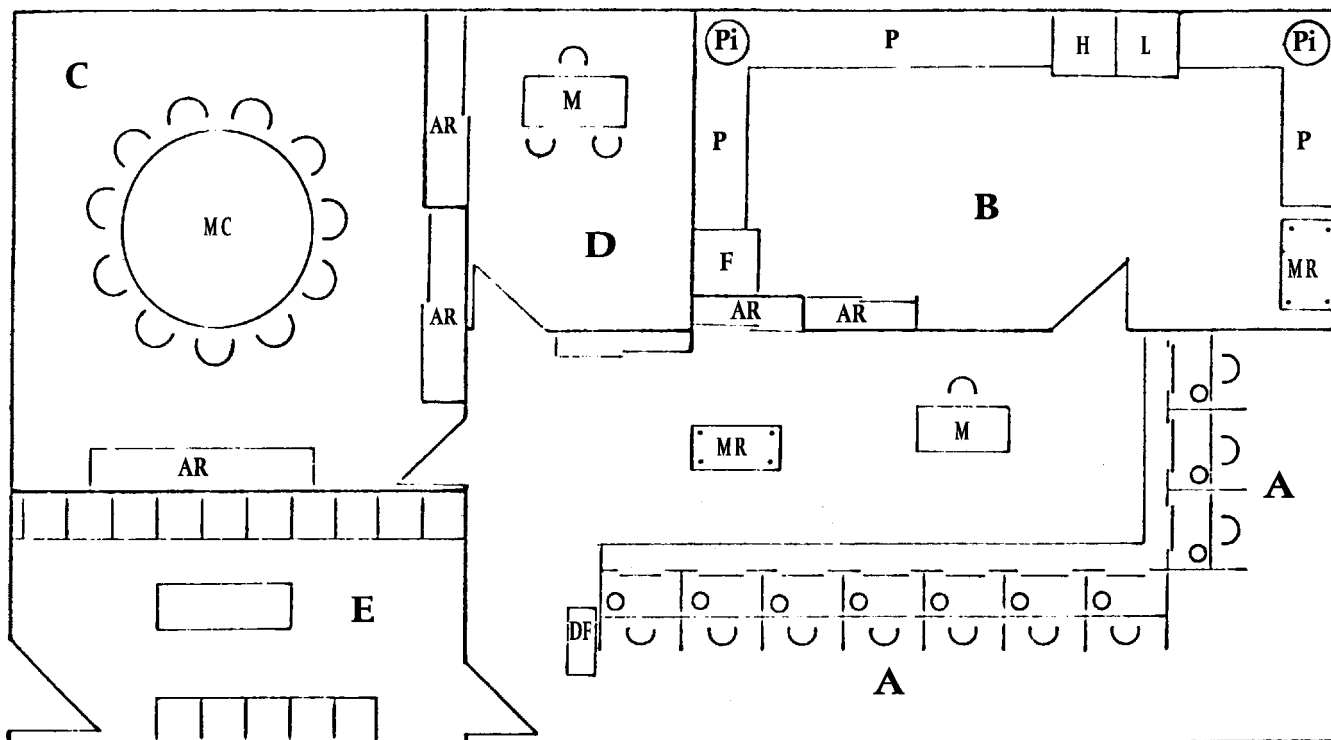
## VÝSUVNÝ POKLOP PRO PŘEDKLÁDÁNÍ VZORKŮ

Obrázek 3



## LABORATOŘ PRO SENZORICKOU ANALÝZU

Obrázek 4 – Příklad zkušební místnosti



- A: Zkušební kabiny
- B: Místnost na čištění přístrojů a pomůcek a přípravu vzorků
- C: Místnost pro otevřené zkoušky
- D: Kancelář
- E: Čekárna
- F: Lednička
- H: Sušárna
- L: Myčka nádobí
- Pi: Výlevka
- AR: Skříň
- MR: Pojízdný stolek
- DF: Výdej formulářů
- MC: Kulatý stůl
- P: Pracovní plocha

## PŘÍLOHA XIII

## NEUTRALIZACE A BĚLENÍ OLIVOVÉHO OLEJE V LABORATOŘI

## 1. NEUTRALIZACE A BĚLENÍ OLIVOVÉHO OLEJE V LABORATOŘI

## 1.1 Neutralizace oleje

## 1.1.1 Přístroje a pomůcky

- vysoká kádinka na 300 ml,
- laboratorní odstředivka se 100ml zkumavkami,
- 250ml kádinka,
- baňky na 100 ml,
- dělicí nálevka na 1 litr.

## 1.1.2 Či n i d l a

- 12 % vodný roztok hydroxidu sodného,
- 1 % roztok fenolftaleinu v ethanolu,
- hexan čistoty p. a.,
- 2-propanol čistoty p. a.

## 1.1.3 Po s t u p

- a) *Oleje s obsahem volných mastných kyselin vyjádřených jako kyselina olejová menším než 30 %*

Do 300ml kádinky se nalije 50 g surového olivového oleje a ohřeje se na 65 °C ve vodní lázni. Přidá se množství 12 % roztoku hydroxidu sodného odpovídající volným mastným kyselinám v oleji s přebytkem 5 % za nepřetržitého mírného míchání. Míchá se dál po dobu pěti minut při teplotě 65 °C.

Směs se převede do 100ml odstředivých zkumavek a odstředěním se oddělí mýdlovou pastu. Dekantovaný olivový olej se nalije do 250ml kádinky, propláchne 50 až 60 ml vařící destilované vody, přičemž se voda odstraní odsáváním. Proplachování se opakuje, dokud se neodstraní všechny stopy zbytkového mýdla (ztratí se růžové zbarvení fenolftaleinu).

Olej se odstředí, aby se odstranila veškerá zbytková voda.

- b) *Oleje s obsahem volných mastných kyselin vyjádřených jako kyselina olejová vyšším než 30 %*

Do 1l dělicí nálevky se nalije 50 g surového oleje, 200 ml hexanu, 100 ml 2-propanolu a množství 12 % roztoku hydroxidu sodného odpovídající volným mastným kyselinám v oleji s přebytkem 0,3 %.

Důkladně se promíchá po dobu jedné minuty. Přidá se 100 ml destilované vody, znovu zamíchá a nechá se usadit.

Po separaci vrstev se umožní odtok spodní vrstvy obsahující mýdlo. Mezi těmito dvěma vrstvami (olivový olej nahoře a voda dole) se často vytvoří mezivrstva tvořená arabskou gumou a nerozpustnými látkami, která musí být rovněž odstraněna.

## 1.2. Bělení neutralizovaného oleje

## 1.2.1 Přístroje a pomůcky

- baňka na 250 ml se třemi zábrusovými skleněnými hrdly pro vložení:
  - a) teploměru s dílky po 1 °C pro měření do 90 °C,
  - b) mechanického míchadla pracujícího při 250 až 300 otáčkách za minutu, vybaveného pro provoz ve vakuu,
  - c) přípojky vývěvy,
- vývěva s manometrem schopná dosáhnout zbytkového tlaku 15 až 30 milibarů.

### 1.2.2 P o s t u p

Do baňky se třemi hrdly se naváží přibližně 100 g neutralizovaného oleje. Vloží se teploměr a míchadlo, připojí se vývěva a olivový olej se za stálého míchání ohřeje na 90 °C. Při této teplotě se pokračuje v míchání, dokud analyzovaný olivový olej není zcela zbaven vody (přibližně 30 minut). Pak se zruší vakuum a přidá se 2 až 3 g aktivované zeminy.

Znovu se zapojí vakuum, dokud se nedosáhne zbytkového tlaku 15 až 30 milibarů, a při teplotě 90 °C se míchá třicet minut rychlostí přibližně 250 otáček za minutu.

Přefiltruje se za horka v termostaticky regulované sušárně (při teplotě 50 až 60 °C).

---

## PŘÍLOHA XIV

## DOPLŇKOVÉ POZNÁMKY 2, 3 A 4 KE KAPITOLE 15 KOMBINOVANÉ NOMENKLATURY

1. „Poznámka 2 A Ve smyslu čísel 1509 a 1510 se výrazem ‚olivový olej‘ se rozumí pouze oleje získané výhradně zpracováním oliv, bez olivového oleje získaného reesterifikací a bez směsí olivového oleje a jiných olejů.

Přítomnost reesterifikovaného olivového oleje nebo jiných olejů se zjišťuje za použití metod uvedených v přílohách V, VII, IX, X a XII. Podíl sterolů a mastných kyselin u všech olivových olejů čísel 1509 a 1510 je uveden v tabulce.

Tabulka I – Podíl mastných kyselin v % na celkovém množství mastných kyselin		Tabulka II – Podíl sterolů v % na celkovém množství sterolů	
kyselina myristová	M 0,1	cholesterol	M 0,5
kyselina linolenová	M 0,9	brassikasterol	M 0,2
kyselina arachidová	M 0,7	kampesterol	M 4,0
kyselina eikosanová	M 0,5	stigmasterol	< kampesterol
kyselina behenová	M 0,3	betasitosterol <sup>(1)</sup>	m 93,0
kyselina lignocerová	M 0,5	delta-7-stigmastenol	M 0,5

M = Maximum  
m = minimum

<sup>(1)</sup> Delta-5, 23-stigmastadienol + cholesterol + betasitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5, 24-stigmastadienol.

**Poznámka 2 B** Panenským olivovým olejem' se rozumí olej získaný výhradně z oliv, při jehož výrobě byly použity pouze mechanické nebo jiné fyzikální postupy, za podmínek, zejména teplotních, které nevedou ke změně jakosti oleje, a jenž neprošel žádným jiným zpracováním kromě čištění, dekantace, odstředění a filtrace, bez oleje získaného pomocí rozpouštědel (číslo 1510) podle definice v odstavcích I a II.

- I. Ve smyslu podpoložky 1509 10 10 se ‚panenským lampantovým olivovým olejem‘ rozumí, nezávisle na jeho obsahu volných mastných kyselin, olivový olej, který má tyto vlastnosti:
- obsah alifatických alkoholů nejvýše 400 mg/kg,
  - obsah erythrodiolu a uvaolu nejvýše 4,5 %,
  - obsah nasycených mastných kyselin v triglyceridech vázaných v poloze 2 nejvýše 1,3 %, a/nebo
  - jednu z těchto vlastností:
    - d1) peroxidové číslo vyšší než 20 milimolů aktivního kyslíku na kg,
    - d2) obsah těkavých halogenovaných rozpouštědel celkem vyšší než 0,2 mg/kg nebo vyšší než 0,1 mg/kg pro každé rozpouštědlo,
    - d3) extinkční koeficient  $K_{270}$  vyšší než 0,250 a po úpravě oleje aktivovaným oxidem hlinitým nejvýše 0,11. Některé oleje, jejichž obsah volných mastných kyselin, vyjádřených jako kyselina olejová, je vyšší než 3,3 g na 100 g, mohou mít po průchodu aktivovaným oxidem hlinitým v souladu s metodou stanovenou v příloze XV extinkční koeficient  $K_{270}$  vyšší než 0,11. V takovém případě musí mít po neutralizaci a bělení provedenými v laboratoři tyto vlastnosti:

- extinkční koeficient  $K_{270}$  nejvýše 1,20;
- odchylku  $\Delta K$  extinkčního koeficientu v oblasti 270 nanometrů vyšší než 0,01, avšak nejvýše 0,16, <sup>(1)</sup>  $K_{m-4}$  a  $K_{m+4}$  = extinkční koeficienty při vlnové délce nižší a vyšší o 4 nanometry než  $K_m$ ;
- d4) organoleptické vlastnosti vykazující zjizitelné vady přesahující přípustný limit a s výsledkem sensorického hodnocení komise nižším než 3,5.

- II. Ve smyslu podpoložky 1509 10 90 se výrazem „panenský olivový olej“ rozumí olivový olej, který má tyto vlastnosti:
- a) obsah volných mastných kyselin, vyjádřený jako kyselina olejová, nejvýše 3,3 g na 100 g;
  - b) peroxidové číslo nejvýše 20 milimolů aktivního kyslíku na kg;
  - c) obsah alifatických alkoholů nejvýše 300 mg/kg;
  - d) obsah těkavých halogenových rozpouštědel celkem nejvýše 0,2 mg/kg a nejvýše 0,1 mg/kg pro každé rozpouštědlo;
  - e) extinkční koeficient  $K_{270}$  nejvýše 0,250 a po úpravě oleje aktivovaným oxidem hlinitým nejvýše 0,10 <sup>(2)</sup> ;
  - f) odchylka extinkčního koeficientu ( $\Delta K$ ) v oblasti 270 nanometrů nejvýše 0,01;
  - g) organoleptické vlastnosti vykazující též zjizitelné závady v rámci přípustného limitu a s výsledkem sensorického hodnocení komisí vyšším než 3,5;
  - h) obsah erythrodiolu a uvaolu nejvýše 4,5 %;
  - i) obsah nasycených mastných kyselin v triglyceridech vázaných v poloze 2 nejvýše 1,3 %.

**Poznámka 2 C** Do položky 1509 90 patří olivový olej získaný zpracováním olivových olejů podpoložky 1509 10 10 nebo 1509 10 90, též smíšený s panenským olivovým olejem, který má tyto vlastnosti:

- a) obsah volných mastných kyselin, vyjádřených jako kyselina olejová, nejvýše 3,3 g na 100 g;
- b) obsah alifatických alkoholů nejvýše 350 mg/kg;
- c) extinkční koeficient  $K_{270}$  vyšší než 0,250 a nejvýše 1,20, a po úpravě oleje aktivovaným oxidem hlinitým nejvýše 0,10 ;
- d) odchylka extinkčního koeficientu ( $\Delta K$ ) vyšší než 0,010 a nejvýše 0,160;
- e) obsah erythrodiolu a uvaolu nejvýše 4,5 %;
- f) obsah nasycených mastných kyselin v triglyceridech vázaných v poloze 2 nejvýše 1,5 %.

**Poznámka 2 D** Ve smyslu podpoložky 1510 00 10 se výrazem „surové oleje“ rozumějí oleje získané zejména z olivových pokrutin, které mají tyto vlastnosti:

- a) obsah volných mastných kyselin, vyjádřených jako kyselina olejová, vyšší než 2 g na 100 g;
- b) obsah erythrodiolu a uvaolu vyšší než 12 %;
- c) obsah nasycených mastných kyselin v triglyceridech vázaných v poloze 2 nejvýše 1,8 %.

**Poznámka 2 E** Do podpoložky 1510 00 90 patří oleje získané zpracováním olejů podpoložky 1510 00 10, též smíšené s panenským olivovým olejem, a oleje, které nemají vlastnosti olejů uvedených v odstavcích I a II za podmínky, že obsah nasycených mastných kyselin v triglyceridech vázaných v poloze 2 je nejvýše 2 %.“

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

$K_m$  = extinkční koeficient při vlnové délce v maximu absorpční křivky v oblasti 270 nanometrů (nm);

<sup>(2)</sup> Pokud je extinkční koeficient  $K_{270}$  vyšší než 0,250, musí být provedena nová zkouška po úpravě oleje aktivovaným oxidem hlinitým. Koeficient  $K_{270}$  pak nesmí přesáhnout 0,10.



2. „Poznámka 3 Do podpoložek 1522 00 31 a 1522 00 39 nepatří:
- a) zbytky ze zpracování tukových látek obsahujících olej s jodovým číslem stanoveným podle metody uvedené v příloze XVI nižším než 70 nebo vyšším než 100;
  - b) zbytky ze zpracování tukových látek obsahujících olej s jodovým číslem vyšším než 70 nebo nižším než 100, u něhož plocha píku představující množství zadržného betasitosterolu stanovená podle přílohy V nařízení uvedeného v doplňkové poznámce 4 níže je nižší než 93,0 % celkové plochy píků sterolů.“
3. „Poznámka 4 Analytické metody stanovení vlastností výše uvedených výrobků jsou obsaženy v přílohách nařízení (EHS) č. 2568/91.“
-

## PŘÍLOHA XV

## 1. STANOVENÍ OBSAHU OLEJE V OLIVOVÝCH POKRUTINÁCH

1.1 **Přístroje a pomůcky**

- 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  $103 \pm 2$  °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 rozele 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 utěsní 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 %.

2.5 **Příprava extrakční baňky**

Extrakční baňka s několika kousky pemzy, která byla předem vysušena v sušárně při teplotě  $103 \pm 2$  °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 rozeleme. 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  $103 \pm 2$  °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 váženími je nejvýše 10 mg. Potom se zaznamená konečná hmotnost baňky.

Na stejném zkušebním vzorku se vždy provedou dvě zkoušky.

## 3. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

### 3.1 Metoda výpočtu a vzorec

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

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

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 původního 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  $\text{ICl}_3$  + 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.

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 přidávkem 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:* Připouští 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:

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

kde

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

V<sub>1</sub> = objem použitého standardního odměrného roztoku thiosíranu sodného (4.4) na slepý pokus v ml,

V<sub>2</sub> = objem použitého standardního odměrného roztoku thiosíranu sodného (4.4) pro vlastní stanovení v ml,

m = hmotnost zkušební vzorku v g (7.1).

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