VERORDNUNG (EWG) Nr. 1058/77 DER KOMMISSION

vom 18. Mai 1977

über Merkmale von Olivenöl und einigen Olivenöl enthaltenden Erzeugnissen sowie zur Änderung des Schemas des Gemeinsamen Zolltarifs in bezug auf Olivenöl

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung Nr. 136/66/EWG des Rates vom 22. September 1966 über die Errichtung einer gemeinsamen Marktorganisation für Fette (1), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 1707/73 (2), insbesondere auf Artikel 13 Absatz 4 und Artikel 18 Absatz 3,

gestützt auf die Verordnung Nr. 162/66/EWG des Rates vom 27. Oktober 1966 über den Handel mit Fetten zwischen der Gemeinschaft und Griechenland (3), insbesondere auf Artikel 3 Absatz 4 und Artikel 9,

gestützt auf die Verordnung (EWG) Nr. 443/72 des Rates vom 29. Februar 1972 über die Abschöpfungen auf raffiniertes Olivenöl und einige olivenölhaltige Erzeugnisse (4), insbesondere auf Artikel 8,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Gegenwärtig werden alle naturreinen Olivenöle unter der Tarifstelle 15.07 A II a) des Gemeinsamen Zolltarifs eingereiht. Daher wird für diese Erzeugnisse eine einzige Abschöpfung festgesetzt. Um den mit der Einfuhrabschöpfung verfolgten Zweck zu erreichen, ist die Abschöpfung nach den verschiedenen Sorten von naturreinem Öl festzusetzen. Zu diesem Zweck sind die Olivenöle nach ihren physikalischen und chemischen Merkmalen zu unterscheiden; das Schema des Gemeinsamen Zolltarifs ist entsprechend anzupassen.

Das sich aus der Anwendung der Verordnung Nr. 136/66/EWG ergebende Zolltarifschema ist im Gemeinsamen Zolltarif im Anhang zur Verordnung (EWG) Nr. 950/68 (5), zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 874/77 (6), wiedergegeben.

Um ein ordnungsgemäßes Funktionieren der Abschöpfungsregelung bei der Einfuhr von Olivenöltrester sicherzustellen, muß ein einheitliches Verfahren zur Bestimmung des Ölgehalts dieser Erzeugnisse vorgesehen werden.

Die Verordnung (EWG) Nr. 618/72 der Kommission vom 29. März 1972 über die Merkmale von Olivenöl und bestimmten, Olivenöl enthaltenden Erzeugnissen (7) ist mehrfach geändert worden, insbesondere durch die Verordnung (EWG) Nr. 3366/75 (8). In Anbetracht der neuerlichen Änderungen, die in diese Verordnung eingearbeitet werden müssen, schien es angezeigt, die Verordnung aufzuheben und sämtliche Vorschriften in einer neuen Verordnung zusammenzufassen.

Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Verwaltungsausschusses für Fette —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

(1) Als Olivenöl im Sinne der Tarifstelle 15.07 A des Gemeinsamen Zolltarifs gilt nur das ausschließlich aus der Verarbeitung von Oliven gewonnene Öl, nicht jedoch wiederverestertes Olivenöl und Mischungen von Olivenöl mit anderen Ölen.

Die Feststellung, ob es sich um wiederverestertes Olivenöl oder Mischungen mit anderen Ölen handelt, erfolgt nach den in den Anhängen VII und VIII beschriebenen Verfahren.

(2) Zu den Tarifstellen 15.07 A I a), 15.07 A I b) und 15.07 A I c) des Gemeinsamen Zolltarifs gehören die Öle, welche die im Anhang I Punkte 1, 2 und 3 aufgeführten Merkmale aufweisen. Die Bestimmung der obengenannten Merkmale erfolgt nach den in den Anhängen IV, V und VI beschriebenen Verfahren.

(3) Zu der Tarifstelle 15.07 A II a) des Gemeinsamen Zolltarifs gehören die Öle, die die in Anhang I Punkt 4 beschriebenen Merkmale aufweisen.

(4) Nicht zur Tarifstelle 15.17 A des Gemeinsamen Zolltarifs gehören die Erzeugnisse der Tarifnummer 15.17, die die in Anhang II beschriebenen Merkmale aufweisen.

Artikel 2

(1) Der Ölgehalt von Oliventrester und anderen Rückständen aus der Olivenölgewinnung der Tarifstelle 23.04 A wird nach dem Verfahren in Anhang IX festgestellt.

(1) ABl. Nr. 172 vom 30. 9. 1966, S. 3025/66.
(2) ABl. Nr. L 175 vom 29. 6. 1973, S. 5.
(3) ABl. Nr. 197 vom 29. 10. 1966, S. 3393/66.
(4) ABl. Nr. L 54 vom 3. 3. 1972, S. 3.
(5) ABl. Nr. L 172 vom 22. 7. 1968, S. 1.
(6) ABl. Nr. L 106 vom 29. 4. 1977, S. 20.
(7) ABl. Nr. L 78 vom 31. 3. 1972, S. 5.
(8) ABl. Nr. L 333 vom 30. 12. 1975, S. 13.

(2) Der Olivenölgehalt gemäß Absatz 1 wird prozentual zu seinem Gewicht in der Trockenmasse ausgedrückt.

Artikel 3

Der Gemeinsame Zolltarif im Anhang zur Verordnung (EWG) Nr. 950/68 wird wie folgt geändert:

1. In der zusätzlichen Vorschrift Nr. 1 zu Kapitel 15 wird „15.07" durch „Tarifstelle 15.07 D" ersetzt.
2. Die zusätzlichen Vorschriften Nr. 2, 3 und 4 zu Kapitel 15 werden durch die zusätzlichen Vorschriften Nr. 2, 3 und 4 im Anhang III zu dieser Verordnung ersetzt.
3. Die Tarifstelle 15.07 A erhält folgende Fassung:

Tarifnummer	Warenbezeichnung	Zollsatz	
		autonom % oder Abschöpfung (Ab)	vertragsmäßig %
1	2	3	4
15.07	A. Olivenöl		
	I. nicht behandelt:		
	a) naturreines Olivenöl	20 (Ab)	—
	b) Lampantöl	20 (Ab)	—
	c) anderes	20 (Ab)	—
	II. anderes		
	a) durch Behandeln von Ölen der Tarifstelle 15.07 A I a) oder 15.07 A I b) gewonnen, auch mit naturreinem Olivenöl verschnitten	20 (Ab)	—
	b) anderes	20 (Ab)	—

Artikel 4

In allen gemeinschaftlichen Rechtsakten, in denen auf die Tarifstellen 15.07 A II oder 15.07 A I a) und b) des Gemeinsamen Zolltarifs Bezug genommen wird, sind hierunter je nach den Merkmalen des betreffenden Erzeugnisses die Tarifstellen 15.07 A I a), b) und c) beziehungsweise 15.07 A II a) und b) des Gemeinsamen Zolltarifs zu verstehen.

Artikel 5

Die Verordnung (EWG) Nr. 618/72 der Kommission vom 29. März 1972 wird aufgehoben.

Artikel 6

Diese Verordnung tritt am 43. Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 18. Mai 1977

Für die Kommission

Der Vizepräsident

Finn GUNDELACH

ANHÄNGE

Inhaltsangabe

		Seite
ANHANG I:	Merkmale von Olivenöl	9
ANHANG II:	Erzeugnisse der Tarifstelle 15.17 A	10
ANHANG III:	Zusätzliche Vorschriften 2, 3 und 4 zu Kapitel 15 des Gemeinsamen Zolltarifs	10
ANHANG IV:	I. Behandlung der Ölprobe mit aktiviertem Aluminiumoxid	12
	II. Neutralisieren und Bleichen des Olivenöls im Laboratorium	12
ANHANG V:	Nachweis von Tresteröl in Olivenöl	14
	A. Die sogenannte Bellier-Methode	14
	B. Die sogenannte modifizierte Vizern-Methode	14
ANHANG VI:	Nachweis von Seife durch Nachweis der Alkalität	16
ANHANG VII:	Nachweis von wiederverestertem Öl	16
ANHANG VIII:	Nachweis von anderen Ölen in Olivenöl durch Analyse der Sterinfraktion von Fettstoffen	20
ANHANG IX:	Methode zur Bestimmung des Olivenölgehalts der Trester	24

ANHANG I

MERKMALE VON OLIVENÖL

1. Als „naturreines Olivenöl" im Sinne der Tarifstelle 15.07 A I a) des Gemeinsamen Zolltarifs gilt natürliches Olivenöl, das nur durch mechanische Verfahren, einschließlich Pressung, gewonnen wurde — ausgenommen jede Mischung mit Olivenöl, das auf andere Weise gewonnen wurde — und das folgende Merkmale aufweist :

   a) Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, höchstens 3 % ;

   b) Extinktionskoeffizient K_{270} (Extinktion einer auf 100 ml aufgefüllten Lösung von 1 g Öl in Isooktan (2,2,4-Trimethylpentan) bei einer Schichtdicke von 1 cm im Wellenlängenbereich von 270 nm) von nicht mehr als 0,25, nach Behandlung der Ölprobe mit aktiviertem Aluminiumoxid nicht mehr als 0,11 ;

   c) Schwankung des Extinktionskoeffizienten im Bereich von 270 nm höchstens 0,01.

   Diese Schwankung ist wie folgt definiert :

   $$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4}).$$

   K_m bezeichnet den Extinktionskoeffizienten für die im Bereich von 270 nm liegende Wellenlänge, die im Maximum der Absorptionskurve liegt.

   K_{m-4} und K_{m+4} bezeichnen die Extinktionskoeffizienten für eine um 4 nm niedriger bzw. höher liegende Wellenlänge als K_m ;

   d) negative Reaktionen bei Anwendung der in Anhang V, Buchstaben A und B beschriebenen Bellier-Methode und der modifizierten Vizern-Methode ;

   e) Nachweis von Seife bei Anwendung der in Anhang VI beschriebenen Methode negativ.

2. Als „Lampantöl" im Sinne der Tarifstelle 15.07 A I b) des Gemeinsamen Zolltarifs gilt unabhängig von seinem Gehalt an freien Fettsäuren Olivenöl, das folgende Merkmale aufweist :

   a) Extinktionskoeffizient K_{270} mehr als 0,25 ; nach Behandlung der Ölprobe mit aktiviertem Aluminiumoxid nicht mehr als 0,11.

   Öle mit einem Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, von mehr als 3 % können nach Behandlung mit aktiviertem Aluminiumoxid einen Extinktionskoeffizienten K_{270} von mehr als 0,11 haben. In diesem Fall muß das Öl, nach Neutralisieren und Bleichen im Laboratorium unter Anwendung der in Anhang IV beschriebenen Methoden

   — einen Extinktionskoeffizienten K_{270} von nicht mehr als 1,10,

   — eine Schwankung des Extinktionskoeffizienten im Bereich von 270 nm von mehr als 0,01, jedoch nicht mehr als 0,16

   aufweisen ;

   b) negative Reaktionen bei Anwendung der in Anhang V, Buchstaben A und B beschriebenen Bellier-Methode und der modifizierten Vizern-Methode ;

   c) Nachweis von Seife bei Anwendung der in Anhang VI beschriebenen Methode negativ.

3. Als Öl im Sinne der Tarifstelle 15.07 A I c) des Gemeinsamen Zolltarifs gilt Öl, insbesondere „Oliventresteröl", das folgende Merkmale aufweist :

   a) Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, mehr als 3 % ;

   b) positive Reaktion bei Anwendung der in Anhang V, Buchstabe A bzw. B beschriebenen Bellier-Methode und/oder der modifizierten Vizern-Methode ;

   c) Nachweis von Seife bei Anwendung der in Anhang VI beschriebenen Methode negativ.

4. Als Olivenöl im Sinne der Tarifstelle 15.07 A II a) des Gemeinsamen Zolltarifs gilt Olivenöl, das durch Behandlung von Ölen der Tarifstellen 15.07 A I a) oder 15.07 A I b) gewonnen wurde, auch mit naturreinem Olivenöl verschnitten, und das folgende Merkmale aufweist :

   a) Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, höchstens 3 % ;

   b) Nachweis von Seife bei Anwendung der in Anhang VI beschriebenen Methode positiv oder

— Extinktionskoeffizient K_{270} mehr als 0,25, jedoch nicht mehr als 1,10 ; nach Behandlung der Ölprobe mit aktiviertem Aluminiumoxid mehr als 0,11 ;

und

— Schwankung des Extinktionskoeffizienten im Bereich von 270 nm mehr als 0,01, jedoch nicht mehr als 0,16.

Diese Schwankung ist wie folgt definiert :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4}).$$

K_m bezeichnet den Extinktionskoeffizienten für die im Bereich von 270 nm liegende Wellenlänge, die im Maximum der Absorptionskurve liegt.

K_{m-4} und K_{m+4} bezeichnen die Extinktionskoeffizienten für eine um 4 nm niedriger bzw. höher liegende Wellenlänge als K_m ;

c) negative Reaktionen bei Anwendung der in Anhang V, Buchstaben A und B beschriebenen Bellier-Methode und der modifizierten Vizern-Methode.

ANHANG II

ERZEUGNISSE DER TARIFSTELLE 15.17 A

Nicht zur Tarifstelle 15.17 A gehören

a) Rückstände aus der Verarbeitung von Fettstoffen, die Öl enthalten, dessen Jodzahl nach der Methode Wijs ohne Katalysator kleiner als 70 oder größer als 100 ist ;

b) Rückstände aus der Verarbeitung von Fettstoffen, die Öl enthalten, dessen Jodzahl zwischen 70 und 100 liegt, bei dem jedoch die Fläche des Peaks, der dem Retentionsvolumen des β-Sitosterins entspricht und der gemäß Anhang VIII bestimmt wurde, weniger als 93 % der Gesamtfläche der Sterinpeaks beträgt.

ANHANG III

ZUSÄTZLICHE VORSCHRIFTEN 2, 3 UND 4 ZU KAPITEL 15 DES GEMEINSAMEN ZOLLTARIFS

2. A. Als Olivenöl im Sinne der Tarifstelle 15.07 A gilt nur das ausschließlich aus der Verarbeitung von Oliven gewonnene Öl, nicht jedoch wiederverestertes Olivenöl und Mischungen von Olivenöl mit anderen Ölen.

B. Als nicht behandeltes Olivenöl gilt Öl mit den nachstehend unter I, II und III beschriebenen Merkmalen.

I. Als „naturreines Olivenöl" im Sinne der Tarifstelle 15.07 A I a) gilt natürliches Olivenöl, das nur durch mechanische Verfahren, einschließlich Pressung, gewonnen wurde — ausgenommen jede Mischung mit Olivenöl, das auf andere Weise gewonnen wurde — und das folgende Merkmale aufweist :

a) Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, höchstens 3 % ;

b) Extinktionskoeffizient K_{270} (Extinktion einer auf 100 ml aufgefüllten Lösung von 1 g Öl in Isooktan (2,2,4-Trimethylpentan) bei einer Schichtdicke von 1 cm im Wellenlängenbereich von 270 nm) von nicht mehr als 0,25, nach Behandlung der Ölprobe mit aktiviertem Aluminiumoxid nicht mehr als 0,11 ;

c) Schwankung des Extinktionskoeffizienten im Bereich von 270 nm höchstens 0,01.

Diese Schwankung ist wie folgt definiert:

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4}).$$

K_m bezeichnet den Extinktionskoeffizienten für die im Bereich von 270 nm liegende Wellenlänge, die im Maximum der Absorptionskurve liegt.

K_{m-4} und K_{m+4} bezeichnen die Extinktionskoeffizienten für eine um 4 nm niedriger bzw. höher liegende Wellenlänge als K_m;

d) negative Reaktionen bei Anwendung der Bellier-Methode und der modifizierten Vizern-Methode;

e) Nachweis von Seife negativ.

II. Als „Lampantöl" im Sinne der Tarifstelle 15.07 A I b) gilt unabhängig von seinem Gehalt an freien Fettsäuren Olivenöl, das folgende Merkmale aufweist:

a) Extinktionskoeffizient K_{270} mehr als 0,25; nach Behandlung der Ölprobe mit aktiviertem Aluminiumoxid nicht mehr als 0,11.

Öle mit einem Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, von mehr als 3 % können nach Behandlung mit aktiviertem Aluminiumoxid einen Extinktionskoeffizienten K_{270} von mehr als 0,11 haben. In diesem Fall muß das Öl, nach Neutralisieren und Bleichen im Laboratorium,

— einen Extinktionskoeffizienten K_{270} von nicht mehr als 1,10,

— eine Schwankung des Extinktionskoeffizienten im Bereich von 270 nm von mehr als 0,01, jedoch nicht mehr als 0,16,

aufweisen;

b) negative Reaktionen bei Anwendung der Bellier-Methode und der modifizierten Vizern-Methode;

c) Nachweis von Seife negativ.

III. Als Öl im Sinne der Tarifstelle 15.07 A I c) gilt Öl, insbesondere „Tresteröl", das folgende Merkmale aufweist:

a) Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, mehr als 3 %;

b) positive Reaktion bei Anwendung der Bellier-Methode und/oder der modifzierten Vizern-Methode;

c) Nachweis von Seife negativ.

C. Als Olivenöl im Sinne der Tarifstelle 15.07 A II a) gilt Olivenöl, das durch Behandlung von Ölen der Tarifstelle 15.07 A I a) oder 15.07 A I b) gewonnen wurde, auch mit naturreinem Olivenöl verschnitten, und das folgende Merkmale aufweist:

a) Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, höchstens 3 %;

b) Nachweis von Seife positiv

oder

— Extinktionskoeffizient K_{270} mehr als 0,25, jedoch nicht mehr als 1,10; nach Behandlung der Ölprobe mit aktiviertem Aluminiumoxid mehr als 0,11,

und

— Schwankung des Extinktionskoeffizienten im Bereich von 270 nm mehr als 0,01, jedoch nicht mehr als 0,16.

Diese Schwankung ist wie folgt definiert:

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4}).$$

K_m bezeichnet den Extinktionskoeffizienten für die im Bereich von 270 nm liegende Wellenlänge, die im Maximum der Absorptionskurve liegt.

K_{m-4} und K_{m+4} bezeichnen die Extinktionskoeffizienten für eine um 4 nm niedriger bzw. höher liegende Wellenlänge als K_m;

c) negative Reaktionen bei Anwendung der Bellier-Methode und der modifizierten Vizern-Methode.

3. Nicht zur Tarifstelle 15.17 A gehören :

   a) Rückstände aus der Verarbeitung von Fettstoffen, die Öl enthalten, dessen Jodzahl nach der Methode Wijs ohne Katalysator kleiner als 70 oder größer als 100 ist ;

   b) Rückstände aus der Verarbeitung von Fettstoffen, die Öl enthalten, dessen Jodzahl zwischen 70 und 100 liegt, bei dem jedoch die Fläche des Peaks, der dem Retentionsvolumen des beta-Sitosterins entspricht und der gemäß Anhang VIII der in der nachstehenden Zusätzlichen Vorschrift 4 genannten Verordnung bestimmt worden ist, weniger als 93 % der Gesamtfläche des Sterinpeaks ausmacht.

4. Für die Bestimmung der Merkmale der obengenannten Waren sind die in den Anhängen der Verordnung (EWG) Nr. 1058/77 beschriebenen Analysemethoden anzuwenden.

ANHANG IV

I. BEHANDLUNG DER ÖLPROBE MIT AKTIVIERTEM ALUMINIUMOXID

1. Man gibt 30 g basisches Aluminiumoxid, das nach dem in Absatz 2 beschriebenen Verfahren hergestellt wurde, in eine chromatographische Säule von etwa 35 mm Durchmesser und 450 mm Länge mit einem Abflußrohr von etwa 10 mm Durchmesser.

   Das Aluminiumoxid wird durch mehrmaliges leichtes Aufstoßen der Säule auf einer Holzunterlage fest geschichtet, wobei die Säule vertikal gehalten wird. In die so vorbereitete Säule gibt man 100 ml einer Lösung von 10 % Öl in Hexan. Das Eluat wird aufgefangen und das Lösungsmittel im Vakuum bei einer Temperatur unterhalb 25 °C verdampft.

   Von dem so gewonnenen Öl wird unverzüglich der Extinktionskoeffizient bei 270 nm bestimmt.

2. Man gewinnt basisches Aluminiumoxid mit der Brockmannschen Aktivitätsstufe I (0 % Wasser), indem man basisches Aluminiumoxid (für Chromatographie) mit einer Korngröße zwischen 30 µm und 130 µm (Mittelwert 80 µm) 3 Stunden bei 380 — 400 °C erhitzt. Zu 100 g dieses Produkts gibt man 5 ml destilliertes Wasser, rührt kräftig um und läßt es über Nacht in einem gut verschlossenen Gefäß stehen. Man erhält so basisches Aluminiumoxid mit einer Brockmannschen Aktivitätsstufe zwischen II und III.

   Prüfung der Aktivität des Aluminiumoxids

   Man gibt 30 g basisches Aluminiumoxid (das nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellt wurde) in eine chromatographische Säule von etwa 35 mm Durchmesser und 450 mm Länge ; durch diese Säule läßt, man unter den in der Methode angegebenen Bedingungen ein Gemisch aus 95 % „naturreinem Olivenöl" und 5 % Erdnußöl laufen. Das „naturreine Olivenöl" soll einen Extinktionskoeffizienten K_{270} von weniger als 0,18 und das beim Raffinieren mit Bleicherde behandelte Erdnußöl einen Extinktionskoeffizienten von nicht weniger als 4 aufweisen. Ergibt diese Mischung einen Extinktionskoeffizienten von mehr als 0,11, so ist das Aluminiumoxid verwendbar. Erfolgt mit diesem Aluminiumoxid keine Elution der konjugierten Triene, so muß stärker hydratisiertes Aluminiumoxid verwendet werden, nachdem überprüft wurde, ob es den Anforderungen des Tests genügt.

II. NEUTRALISIEREN UND BLEICHEN DES OLIVENÖLS IM LABORATORIUM

A. NEUTRALISIEREN DES ÖLS

1. **Geräte**

   — hohes 300-ml-Becherglas,
   — Laborzentrifuge mit 100-ml-Gläsern,
   — 250-ml-Becherglas,
   — 100-ml-Rundkolben,
   — 1-Liter-Scheidetrichter.

2. **Reagenzien**

— 12 %ige wäßrige Natriumhydroxidlösung,
— 1 %ige Lösung von Phenolphthalein in Äthylalkohol,
— Hexan analysenrein,
— Isopropylalkohol, analysenrein.

3. **Verfahren**

a) *Öle mit einem Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, von weniger als 30 %*

Man gibt 50 g rohes Öl in ein hohes 300-ml-Becherglas und erwärmt im Wasserbad auf 65 °C. Unter langsamem Rühren gibt man — mit einem Überschuß von 5 % — so viel 12 %ige Natriumhydroxidlösung hinzu, wie dem Gehalt des Öls an freien Fettsäuren entspricht. Unter Aufrechterhaltung der Temperatur von 65 °C wird 5 Minuten weitergerührt.

Das Ganze wird in 100-ml-Zentrifugengläser überführt und die Seifenmasse durch Zentrifugieren abgetrennt. Das dekantierte Öl wird in ein 250-ml-Becherglas gegeben und mit 50 bis 60 ml kochendem destilliertem Wasser gewaschen. Die wäßrige Phase wird mit Hilfe eines Saughebers entfernt. Die Waschungen werden wiederholt, bis auch Spuren von Seifenresten entfernt sind (Verschwinden der Rosafärbung des Phenolphthaleins).

Zur Entfernung der geringen Restwassermengen wird das Öl zentrifugiert.

b) *Öle mit einem Gehalt an freien Fettsäuren, berechnet als Ölsäure, von mehr als 30 %*

In einen 1-Liter-Scheidetrichter gibt man 50 g rohes Öl, 200 ml Hexan, 100 ml Isopropylalkohol und — mit einem Überschuß von 0,3 % — so viel 12 %ige Natriumhydroxidlösung, wie dem Gehalt des Öls an freien Fettsäuren entspricht.

Eine Minute lang kräftig rühren. 100 ml destilliertes Wasser hinzugeben, erneut rühren und stehen lassen. Nach der Phasentrennung wird die untere seifenhaltige Schicht abgelassen. In vielen Fällen bildet sich zwischen den beiden Phasen (ölhaltige obere und wäßrige untere Schicht) eine Zwischenschicht, die Schleimstoffe und unlösliche Substanzen enthält und die ebenfalls entfernt werden muß.

Anschließend wird die Hexanlösung des neutralen Öls mit Portionen von jeweils 50 bis 60 ml einer Lösung aus Isopropylalkohol und destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 1 (Volumenteile) bis zum Verschwinden der Rosafärbung des Phenolphthaleins gewaschen. Darauf wird das Hexan durch Abdestillieren im Vakuum (z.B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers) vollständig entfernt.

B. BLEICHEN DES NEUTRALISIERTEN ÖLS

1. **Geräte**

— 250-ml-Dreihalskolben mit Schliffansätzen für :
  a) Thermometer mit Unterteilung in 1 °C für Messungen bis 90 °C,
  b) mechanisches Rührwerk, 250 bis 300 Umdrehungen/min., geeignet zum Betrieb im Vakuum,
  c) Anschluß für die Vakuumpumpe ;
— Vakuumpumpe für 15 bis 30 Millibar Endvakuum, mit Manometer.

2. **Verfahren**

In den Dreihalskolben werden etwa 100 g neutralisiertes Öl eingewogen. Thermometer und Rührwerk einführen ; Vakuumpumpe anschließen und auf 90 °C unter Umrühren erwärmen ; die Temperatur wird unter ständigem Rühren so lange aufrechterhalten, bis das zu untersuchende Öl vollständig vom Wasser befreit ist (etwa 30 Minuten).

Danach wird das Vakuum unterbrochen und 2 bis 3 g aktivierte Bleicherde zugegeben.

Dann wird wieder ein Vakuum mit einem Druck von 15 bis 30 Millibar hergestellt, wobei über eine Zeit von 30 Minuten die Temperatur auf 90 °C und die Drehzahl des Rührwerks bei etwa 250 Umdrehungen/min. gehalten werden. Danach wird in einem thermostatisch regulierten Trockenschrank warm filtriert (50—60 C).

ANHANG V

NACHWEIS VON TRESTERÖL IN OLIVENÖL

A. DIE SOGENANNTE BELLIER-METHODE

1. Geräte

— 100-ml-Rundkolben mit Rückflußkühler,

— 5-ml-Meßpipette mit 0,1 ml Graduierung,

— Heizvorrichtung, die ein Erwärmen des Kolbens auf etwa 80 °C ermöglicht,

— Thermometer von 15 bis 60 °C.

2. Reagenzien

— wäßrig-alkoholische Kalilauge (42,5 g KOH in 72 ml destilliertem Wasser auflösen und mit 95 vol.%igem Äthylalkohol auf 500 ml auffüllen),

— 70 vol.%iger Äthylalkohol,

— wäßrige Lösung von Essigsäure 1 + 2 (Volumenteile); 1,5 ml müssen genau 5 ml der wäßrig-alkoholischen Kalilauge unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator neutralisieren.

3. Vorbereitung der Probe

Das Öl wird durch Dekantieren und Filtrieren durch ein Papierfilter vom Wasser befreit bei einer Temperatur, die geringfügig über dem Schmelzpunkt einiger fester Bestandteile liegt, die sich möglicherweise aus dem flüssigen Öl abgesetzt haben.

4. Arbeitsvorschrift

In den Kolben etwa 1 ml des nach Absatz 3 vorbereiteten Öls geben. 5 ml wäßrig-alkoholische Kalilauge hinzufügen. Den Rückflußkühler anschließen und 10 Minuten unter gelegentlichem Schütteln kochen. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen. 1,5 ml der wäßrigen Essigsäurelösung und 50 ml des zuvor auf 50 °C erwärmten Äthylalkohols zugeben. Durch Umrühren mischen, das Thermometer einführen und abkühlen lassen, wobei das Aussehen der Lösung beobachtet wird, sobald sie die Temperatur 45 °C erreicht hat. Bildet sich bei mehr als 40 °C ein flockiger Niederschlag, so ist die Reaktion positiv. Bildet sich kein flockiger Niederschlag, so wird die Lösung bei Raumtemperatur, d.h. zwischen 20 und 22 °C, mindestens 24 Stunden, erforderlichenfalls 48 Stunden, stehengelassen und erneut beobachtet. Bildet sich ein in der Mitte der Lösung suspendierter flockiger Niederschlag, so ist die Reaktion ebenfalls positiv.

Formulierung der Ergebnisse

Nachweis von Tresteröl (Bellier-Methode): positiv oder negativ.

B. DIE SOGENANNTE MODIFIZIERTE VIZERN-METHODE

Das Unverseifbare des zu analysierenden Öls wird isoliert und sein Verhalten in einer Lösung von 85 vol.%igem Alkohol unter bestimmten Bedingungen geprüft.

1. Geräte

— 300-ml-Kolben aus alkaliresistentem Glas mit Rückflußkühler,

— 500-ml- oder 1 000-ml-Scheidetrichter,

— 300-ml- und 250-ml-Kolben,

— Reagenzglas.

2. **Reagenzien**

— 2N alkoholische Kaliumhydroxidlösung,

— Petroläther,

— 50%iger Äthylalkohol,

— 96 vol.%iger Alkohol,

— 10%iges Wasserstoffperoxid,

— 85 vol.%iger Alkohol.

3. **Arbeitsvorschrift**

Man wiegt etwa 5 g der zu analysierenden Probe in einen 300-ml-Kolben. 50 ml 2N alkoholische Kaliumhydroxidlösung werden zugegeben. Der Rückflußkühler wird aufgesetzt und es wird vorsichtig zum Sieden erhitzt. Nach einstündiger Erhitzung wird umgerührt, auf 30 - 35 °C abgekühlt und unter Verwendung von 50 ml Wasser in einen Scheidetrichter überführt.

Der Kolben wird sorgfältig mit 50 ml Petroläther ausgespült und dieser Vorgang mehrmals wiederholt. Der Petroläther wird in den Scheidetrichter gegeben. Der Inhalt wird eine Minute kräftig geschüttelt. Nach dem Absetzen wird die wäßrige Phase abgetrennt, indem sie in einen zweiten Scheidetrichter überführt wird. Man gibt nochmals 50 ml Petroläther zu, schüttelt kräftig etwas mehr als eine Minute und läßt absetzen. Die wäßrige Phase wird in einen dritten Scheidetrichter überführt, in den man wieder 50 ml Petroläther gibt. Danach wird kräftig geschüttelt und man läßt absetzen.

Die Petrolätherextrakte der einzelnen Extraktionen des Unverseifbaren werden in einem Scheidetrichter gesammelt und wenigstens drei mal mit 50%igem Alkohol (jeweils 50 ml) gewaschen, bis das Waschwasser gegen Phenolphthalein nicht mehr alkalisch reagiert.

Die Lösung des Unverseifbaren wird in einen 300-ml-Kolben filtriert, das Filter mit Petroläther gewaschen und das Lösungsmittel abdestilliert. Es werden 10 ml 96%igen Alkohols zugegeben und nach vorsichtigem Erwärmen (auf etwa 40 °C) in ein 100-ml-Kölbchen filtriert. Der 300-ml-Kolben wird mit 10 ml 96%igem Alkohol gewaschen, anschließend wird in den zweiten Kolben filtriert.

In den 100-ml-Kolben, der die alkoholischen Extrakte des Unverseifbaren enthält, werden 5 ml 10%iges Wasserstoffperoxid gegeben ; auf dem Wasserbad wird bis zur Trockene eingedampft. Es werden nochmals 20 ml 96%igen Alkohols und 5 ml Wasserstoffperoxid zugegeben, es wird wieder zur Trockene eingedampft.

Der Kolben wird vom Wasserbad genommen und 20 ml 85%igen Alkohols zugegeben. Es wird vorsichtig auf dem Wasserbad erhitzt, wobei Alkoholverluste sorgfältig vermieden werden müssen, um die Konzentration nicht zu verringern. Das ist sehr wichtig und sollte nicht außer Acht gelassen werden.

Man filtriert durch ein Papierfilter in ein Reagenzglas, läßt abkühlen und prüft das Verhalten der Lösung nach einer Stunde und nach 4 Stunden. Ist die Lösung nach einer Stunde völlig transparent, so ist das Analysenergebnis negativ, das heißt, daß das Öl kein Tresteröl enthält.

Wenn die Lösung nach einer Stunde trübe ist, wird nach 4 Stunden erneut beobachtet.

Wenn die Lösung nach 4 Stunden noch trübe ist, aber keine Flöckchen vorhanden sind, ist das Analysenergebnis wieder negativ. Wenn andererseits die Bildung von Flöckchen beobachtet wird, so ist das Analysenergebnis positiv und Tresteröl vorhanden.

Formulierung der Ergebnisse

Nachweis von Tresteröl (modifizierte Vizern-Methode) : positiv oder negativ.

Anmerkung :

Olivenöle ergeben während des Tests eine transparente oder höchstens schwach opaleszierende Lösung. Tresteröle oder Mischungen von Tresterölen zeigen charakteristische Flöckchen, die wie kleine Wölkchen suspendiert bleiben und die sich erst nach mehreren Stunden ruhigen Stehens absetzen.

ANHANG VI

NACHWEIS VON SEIFE DURCH NACHWEIS DER ALKALITÄT

Prinzip der Methode

Nachweis alkalischer Seifen durch Bromphenolblau.

Reagenzien

— 0,1 %ige Lösung von Bromphenolblau in 96 vol.%igem Alkohol,

— Aceton, frisch destilliert, dem 2 Vol.% Wasser zugesetzt wurden.

Das 2 % Wasser enthaltende Aceton soll nach Zusatz von einigen Tropfen der Bromphenolblau-Lösung eine gelbliche oder gelb-grünliche Farbe besitzen.

Geräte

Reagenzglas 150 mm × 15 mm.

Arbeitsvorschrift

Man gibt in das Reagenzglas 10 ml Aceton und einen Tropfen Bromphenolblau-Lösung ; die Lösung muß gelblich werden. Wenn nicht, sind Reagenzglas und Stopfen mit Aceton zu spülen, bis die Blaufärbung verschwindet. Es werden 10 g Öl in das Reagenzglas gegeben, das dann mit einem sauberen Stopfen verschlossen wird. Man schüttelt und läßt stehen. Ein Farbumschlag der oberen Acetonschicht nach blau zeigt das Vorhandensein von Seife an.

Formulierung der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden als positiv oder als negativ bezeichnet.

ANHANG VII

NACHWEIS VON WIEDERVERESTERTEM ÖL

Zweck der Methode ist die Bestimmung der Zusammensetzung der Fraktion der Fettsäuren, die in Ölen und Fetten in 2-Stellung (β-Stellung oder innerer Stellung) des Glycerins verestert sind.

Wiederveresterte Olivenöle enthalten in β-Stellung mehr Palmitinsäure als Olivenöle, die nicht wiederverestert wurden.

Prinzip :

Die Methode beruht auf der partiellen und selektiven Hydrolyse der Triglyceride durch Pankreaslipase, wobei vorwiegend 2-Monoglyceride entstehen. Durch die Hydrolyse entsteht ein Gemisch, das neben nichthydrolysierten Triglyceriden noch Diglyceride, 2-Monoglyceride und freie Fettsäuren enthält. Das Gemisch wird mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie fraktioniert und die Monoglyceride werden isoliert. Die Monoglyceride werden mit Methanol umgeestert und die gewonnenen Methylester gaschromatographisch analysiert.

Wenn der Palmitinsäuregehalt in 2-Stellung der Triglyceride 2 % überschreitet, muß man davon ausgehen, daß dem analysierten Erzeugnis wiederverestertes Öl zugesetzt wurde.

1. **Geräte**

— 500-ml-Scheidetrichter,

— chromatographische Säule aus Glas, innerer Durchmesser 13 mm, Länge 400 mm, ausgestattet mit Hahn und gläsernem Frittenboden,

— 250-ml-Weithalskolben,

— 100-ml-Kolben,

— 10-ml-Zentrifugenröhrchen, mit Schliffstopfen,

— 1-ml-Injektionsspritze, mit feiner Kanüle,

— 25-ml-Kolben mit Luftkühler von etwa 1 Meter Länge und Schliffansatz,
— 50-ml-Becherglas,
— 5-ml-Bürette mit 1/20 ml Graduierung,
— Beschichtungsgerät für die Dünnschicht-Chromatographie mit 20 × 20 cm Glasplatten,
— Mikrospritze zur Abgabe von 3-4 µl-Tropfen,
— Rotationsverdampfer,
— Trockenschrank, einstellbar auf 103 °C ± 2 °C,
— Thermostat, einstellbar auf Temperaturen zwischen 30 und 45 °C ± 0,5 °C,
— elektrisches Schüttel- und Vibriergerät zum kräftigen Schütteln der Zentrifugenröhrchen,
— Sprüher für die Dünnschicht-Chromatographie,
— UV-Lampe zur Betrachtung der Dünnschichtplatten,
— Laborrührwerk zum Zerkleinern und Mischen von heterogenem Material,
— pH-Meter,
— Propellerrührer,
— Stoppuhr.

2. **Reagenzien**

— 12%ige (Gew./Vol.) wäßrige Natriumhydroxidlösung,
— 1%ige (Gew./Vol.) Lösung von Phenolphthalein in 95 vol.%igem Äthanol,
— Diäthyläther, peroxidfrei,
— Isopropylalkohol oder 95 vol.%iger Äthylalkohol, p.a.,
— aktiviertes Aluminiumoxid zur Chromatographie, neutral, Aktivitätsstufe I nach Brockmann, unmittelbar vorher 2 Stunden bei 260 °C aktiviert und im Exsikkator aufbewahrt,
— Hexan oder — falls nicht verfügbar — Petroläther (Siedepunkt 30-50 °C), zur Chromatographie,
— Ameisensäure, mindestens 98 gew.%ig,
— Pankreaslipase mit ausreichender Aktivität (Anmerkungen 1 und 2),
— Pufferlösung : wäßrige 1 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Lösung mit 6 N Salzsäure auf pH 8 eingestellt (potentiometrische Kontrolle),
— 0,1%ige (Gew./Vol.) wäßrige Natriumcholatlösung (enzymatische Qualität),
— 6 N Salzsäure,
— Fließmittel : Hexan oder — falls nicht verfügbar — Petroläther/Diäthyläther/Ameisensäure : 70/30/1 (Vol./Vol./Vol.),
— 10%ige (Gew./Vol.) wäßrige Gummiarabicumlösung,
— 22%ige (gew./Vol.) wäßrige Kalziumchloridlösung ($CaCl_2$),
— 0,2%ige (Gew./Vol.) alkoholische 2',7'-Dichlorfluoresceinlösung, durch Zusatz von einem Tropfen 1 N Natriumhydroxid je 100 ml schwach alkalisch gemacht,
— Kieselgel in Pulverform, mit Bindemittel, Dünnschicht-Qualität,
— 20%ige (Gew./Vol.) wäßrige Natriumcholatlösung,
— 0,1 N wäßrige Natriumhydroxidlösung,
— neutralisiertes pflanzliches Öl.

3. **Vorbereitung der Probe**

Probe mit weniger als 3 % freien Fettsäuren : Neutralisation direkt auf dem Aluminiumoxid wie unter 3.2 beschrieben.

Probe mit mehr als 3 % freien Fettsäuren : Alkalineutralisation in Gegenwart eines Lösungsmittels gemäß 3.1, anschließend Durchlauf über Aluminiumoxid wie unter 3.2 beschrieben.

3.1. *Neutralisation durch Alkali in Gegenwart eines Lösungsmittels*

In einen 500-ml-Scheidetrichter gibt man etwa 10 g rohes Öl, 100 ml Hexan oder — wenn nicht vorhanden — Petroläther, 50 ml Isopropylalkohol oder 95%igen Äthylalkohol, einige Tropfen Phenolphthaleinlösung und mit einem Überschuß von 0,3 % soviel 12%ige Natriumhydroxidlösung, wie dem Gehalt des Öles an freien Fettsäuren entspricht. Es wird eine Minute kräftig gerührt, dann werden 50 ml destilliertes Wasser zugegeben, nochmals gerührt und dann stehen gelassen.

Nach dem Absetzen wird die untere, die Seifen enthaltende Schicht entfernt. Entfernt werden auch eventuelle Zwischenschichten (Schleim und Unlösliches). Die neutralisierte Hexanlösung des Öles wird nacheinander mit 25 oder 30 ml einer Lösung von Isopropylalkohol oder Äthylalkohol und destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 1 (Vol./Vol.) bis zum Verschwinden der Rosafärbung des Phenolphthaleins gewaschen.

Man entfernt den größten Teil des Hexans durch Vakuumdestillation und trocknet das Öl bis zum völligen Verschwinden des Lösungsmittels bei 30-40 °C unter Vakuum im Stickstoffstrom.

3.2. *Durchlauf über Aluminiumoxid*

15 g aktiviertes Aluminiumoxid werden in 50 ml Hexan oder —wenn nicht vorhanden— in Petroläther suspendiert und unter Rühren in eine chromatographische Glassäule gegossen. Das Aluminiumoxid wird gleichmäßig verteilt, und man läßt das Lösungsmittel bis auf 1-2 mm oberhalb des Absorptionsmittels ablaufen. Dann wird eine etwa 15 Minuten zuvor hergestellte Lösung aus 5 g Öl in 25 ml Hexan oder — wenn nicht vorhanden — in Petroläther vorsichtig auf die Säule gegeben und die gesamte aus der Säule ablaufende Flüssigkeit in einem 100-ml-Kolben gesammelt.

Der größte Teil des Lösungsmittels wird durch Vakuumdestillation entfernt ; dann wird das Öl bei 30-40 °C unter Vakuum mit Hilfe eines Stickstoffstromes bis zum völligen Verschwinden des Lösungsmittels getrocknet.

4. Herstellung der Dünnschicht-Platten

Man gibt in einen 250-ml-Weithalskolben 30 g Kieselgel in Pulverform mit Bindemittel und 60 ml destilliertes Wasser und schüttelt, bis sich ein homogener Brei bildet. Dieser wird eine Minute durch Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe entgast.

Der Brei wird wie üblich mit dem Beschichtungsgerät in einer 0,25 mm dicken Schicht auf die Platten aufgetragen.

Die Menge genügt zur Herstellung von fünf Platten vom Format 20 × 20 cm. Man läßt die Platten etwa 15 Minuten an der Luft, anschließend zwei Stunden im Trockenschrank bei 103 °C ± 2 °C trocknen. Die so hergestellten Platten werden im Exsikkator aufbewahrt.

5. Verfahren

5.1. *Hydrolyse durch Pankreaslipase*

In ein 10-ml-Zentrifugenröhrchen werden etwa 0,1 g der Probe eingewogen.

Man setzt 20 mg Lipase und 2 ml Pufferlösung zu. Es wird sorgfältig und vorsichtig geschüttelt. Anschließend werden 0,5 ml der 0,1%igen Natriumcholatlösung und 0,2 ml der Kalziumchloridlösung zugesetzt. Das Röhrchen wird mit einem Schliffstopfen verschlossen, vorsichtig geschüttelt (ohne den Stopfen zu befeuchten) und sofort in den auf 40 °C ± 0,5 °C eingestellten Thermostaten gesetzt, wobei genau eine Minute geschüttelt wird.

Das Röhrchen wird aus dem Thermostaten genommen und genau zwei Minuten kräftig geschüttelt.

Danach wird sofort unter fließendem Wasser gekühlt ; es werden 1 ml 6 N Salzsäure und 1 ml Diäthyläther zugesetzt. Das Röhrchen wird verschlossen, kräftig geschüttelt und dann stehen gelassen. Anschließend wird die obere organische Phase mit Hilfe der Spritze abgenommen.

5.2. *Abtrennung der Monoglyceride durch Dünnschicht-Chromatographie*

Der Extrakt wird im Abstand von etwa 1,5 cm vom unteren Rand der Platte als durchgehender einheitlicher Strich aufgetragen, wobei eine möglichst feine Startlinie entstehen sollte.

Die Platte wird in eine gut gesättigte Entwicklungskammer gestellt und mit dem Fließmittel bis zu etwa 1 cm Abstand vom oberen Rand entwickelt. Die Entwicklung der Platte erfolgt bei etwa 20 °C.

Die Platte wird an der Luft bei der gleichen Temperatur, wie sie in der Entwicklungskammer herrscht, getrocknet und mit 2',7'-Dichlorfluorescein-Lösung besprüht. Die Monoglyceridbande (Rf etwa 0,035) wird unter UV-Licht markiert, mit einem Metallspatel abgekratzt (wobei zu vermeiden ist, daß auch die auf der Startlinie verbliebenen Bestandteile entfernt werden) und das Kieselgel in dem 25-ml-Methylierungskölbchen gesammelt.

Die Monoglyceride werden in Methylester umgeestert, indem das zuvor gesammelte Kieselgel direkt nach der unter Punkt 7.3 beschriebenen allgemeinen Methode zur Herstellung von Fettsäuremethylestern behandelt wird. Die Ester werden dann nach der unter Punkt 7.4 genannten Methode gaschromatographisch untersucht.

Von derselben Probe ist auch die Zusammensetzung der Gesamtfettsäuren zu bestimmen. Ein Vergleich mit der Zusammensetzung der in 2-Stellung veresterten Fettsäuren ist zur Interpretation der Ergebnisse nützlich.

6. Formulierung der Ergebnisse

Die Zusammensetzung der Fettsäuren in 2-Stellung wird in Prozenten auf eine Dezimale genau angegeben (Anmerkung 3).

7. Anmerkungen

7.1. *Kontrolle der Lipaseaktivität*

Durch etwa 10 Minuten langes Rühren eines Gemisches aus 165 ml 10%iger Gummiarabicumlösung, 15 g zerstoßenem Eis und 20 ml des zuvor neutralisierten Öles in einem geeigneten Mischgerät wird eine Ölemulsion hergestellt.

In ein 50-ml-Becherglas werden nacheinander 10 ml der Emulsion, 0,3 ml der 20%igen Natriumcholatlösung und 20 ml destilliertes Wasser gegeben.

Das Becherglas wird in den auf 37 °C ± 0,5 °C eingestellten Thermostat gestellt, und es werden die Elektroden eines pH-Meßgeräts und der Propellerrührer in das Becherglas geführt.

Mit einer 5-ml-Bürette wird die 0,1-N-Natriumhydroxidlösung Tropfen für Tropfen bis zu pH 8,5 zugesetzt.

Dann wird eine entsprechende Menge der wäßrigen Suspension des Lipasepulvers (siehe unten) zugesetzt. Wenn das pH-Meßgerät den pH-Wert 8,3 anzeigt, wird die Stoppuhr angestellt und laufend so viel 0,1-N-Natriumhydroxidlösung zugesetzt, daß der pH-Wert auf 8,3 gehalten wird. Die verbrauchte Menge der Alkalilösung wird jede Minute notiert. Die erhaltenen Werte werden in ein Koordinatensystem eingetragen, und zwar mit der Zeit als Abszisse und der zur Konstanthaltung des pH-Wertes erforderlichen Alkalilösung in ml als Ordinate. Dabei muß sich eine Gerade ergeben.

Die im vorigen Absatz erwähnte Lipasesuspension ist eine 1 gew.%ige Suspension in Wasser. Für jeden Versuch wird so viel Suspension eingesetzt, wie erforderlich, damit in 4 oder 5 Minuten etwa 1 ml Alkalilösung verbraucht wird. Normalerweise wird dies mit 1 bis 5 mg Lipasepulver erreicht.

Als Lipaseeinheit ist die Enzymmenge definiert, die 10 µ-Äquiv. Säure pro Minute freisetzt.

Die Aktivität „A" des verwendeten Pulvers, ausgedrückt in Lipaseeinheiten je mg, berechnet sich wie folgt:

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

dabei sind: V = Anzahl ml 0,1-N-Natriumhydroxidlösung, die pro Minute verbraucht werden, berechnet aus der graphischen Darstellung,

m = Gewicht der Lipase-Probe in mg.

Die verwendete Lipase muß eine Aktivität zwischen 0,8 und 2 Lipaseeinheiten je mg besitzen.

7.2. *Herstellung der Lipase*

Im Handel sind Lipasen mit ausreichender Lipaseaktivität erhältlich. Sie können aber auch im Labor wie folgt hergestellt werden:

5 kg frisches Schweinepankreas werden auf 0 °C abgekühlt, von den umhüllenden festen Fetten und Geweben befreit und mit Hilfe einer Schneidemühle so zerkleinert, daß ein flüssiger Brei entsteht. Dieser wird 4 bis 6 Stunden kalt mit 2,5 l wasserfreiem Aceton gerührt und anschließend zentrifugiert. Der Rückstand wird noch dreimal mit der gleichen Menge Aceton, zweimal mit einem Gemisch aus Aceton und Diäthyläther 1 : 1 (Vol./Vol.) und zweimal mit Diäthyläther extrahiert.

Um ein haltbares Pulver zu erhalten, wird der Rückstand 48 Stunden im Vakuum getrocknet und im Kühlschrank aufbewahrt.

7.3. *Herstellung der Fettsäure-Methylester*

Nach der Methode, beschrieben unter Punkt II des Anhangs VI der Verordnung (EWG) Nr. 72/77 der Kommission vom 13. Januar 1977 (1), die die Verordnung (EWG) Nr. 1470/68 über die Entnahme und Verkleinerung von Proben sowie über die Bestimmung des Gehalts der Ölsaaten an Öl, Fremdbestandteilen und Feuchtigkeit ändert.

7.4. *Gaschromatographie von Fettsäure-Methylestern*

Nach der unter Punkt III des Anhangs VI der Verordnung (EWG) Nr. 72/77 beschriebenen Methode.

---

(1) ABl. Nr. L 12 vom 15. 1. 1977, S. 11.

ANHANG VIII

NACHWEIS VON ANDEREN ÖLEN IM OLIVENÖL DURCH ANALYSE DER STERINFRAKTION VON FETTSTOFFEN

Prinzip

Gas-chromatographische Analyse der aus dem Unverseifbaren durch Dünnschicht-Chromatographie abgetrennten Sterine. Das Unverseifbare darf nur vorsichtig getrocknet werden.

Geräte

1. Geräte für die Dünnschicht-Chromatographie einschließlich vier Glasplatten 20 × 20 × 0,4 cm, zwei Platten 20 × 5 × 0,4 cm sowie eine 0.1-ml-Mikrospritze ;
2. 50-ml-Becherglas ;
3. Glasfiltertiegel, Durchlässigkeit 3, Durchmesser 15 mm ;
4. 100-ml-Rundkolben ;
5. 10-ml-Zentrifugenglas mit konischem Boden und Schliffstopfen ;
6. 1-ml-Meßpipette mit Graduierung ;
7. Gas-Chromatograph, ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor, einem Silber- oder Glaseinspritzsystem oder einem System zur direkten Einspritzung auf die Säule sowie einem Schreiber ;
8. Säule für die Gas-Chromatographie aus Glas oder nichtrostendem Stahl, U- oder spiralförmig, Länge 1-2 m, Innendurchmesser 3-4 mm. Die Säulenfüllung enthält als stationäre Phase Methylsilicongummi (1), das wenigstens bis 300 °C beständig ist. Damit wird kalzinierte, mit Säure gewaschene und silanisierte Diatomeenerde zu 2-4 % imprägniert ; Korngröße 80/100 oder 100/200 mesh.

   Anmerkung : Da einige Säulentypen aus rostfreiem Stahl infolge Zersetzung von Sterinen zu fehlerhaften Ergebnissen führen können, wird Glas empfohlen.
9. Mikrospritze für Mengen von 5 oder 10 µl.

Reagenzien

1. Chloroform zur Chromatographie ;
2. Benzol zur Chromatographie ;
3. Heptan ;
4. Kieselgel (z.B. Kieselgel G) ;
5. Bezugslösung für die Dünnschicht-Chromatographie 5%ige Cholesterinlösung in Chloroform ;
6. Aceton zur Chromatographie ;
7. 0,1%ige Lösung des Natriumsalzes des 2',7'-Dichlorfluoresceins in absolutem Äthylalkohol ;
8. Pyridin ;
9. Hexamethyldisilazan ;
10. Trimethylchlorsilan ;
11. Lösung für den Empfindlichkeitstest : 1 mg Cholesterin pro ml n-Pentan ;
12. Lösung für den Peakauflösungstest : 0,9 mg Rüböl-Phytosterine und 0,1 mg Cholesterin pro ml n-Pentan. Die Sterine müssen nach dem unter Punkt B der „Arbeitsvorschrift" beschriebenen Verfahren frisch hergestellt werden ;
13. Lösung für den Referenztest : 1 mg Sonnenblumenöl-Phytosterine pro ml n-Pentan, frisch hergestellt wie unter Punkt B der „Arbeitsvorschrift" beschrieben.

Herstellung der Dünnschichtplatten

Auf das Beschichtungsgerät werden der Reihe nach eine Platte von 20 × 5 × 0,4 cm, vier Platten von 20 × 20 × 0,4 cm und eine Platte von 20 × 5 × 0,4 cm gelegt.

(1) Z.B. SE 30.

In einen 500-ml-Weithalskolben werden 40 g Kieselgel und etwa 80 ml Wasser gegeben. Mit einem Glasstab bzw. mit einem mechanischen Glasrührwerk wird umgerührt, bis eine homogene Suspension entsteht.

Etwa eingeschlossene Gase werden durch mindestens einminütiges Evakuieren mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Danach wird die Suspension in das Streichgerät gegeben, eine Schichtdicke von 0,5 mm eingestellt und die Platten werden gleichmäßig beschichtet.

Die Platten werden etwa 15 Minuten an der Luft und anschließend 2 Stunden im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet. Die so hergestellten Platten werden im Exsikkator unter Vakuum aufbewahrt.

ARBEITSVORSCHRIFT

A. Herstellung des Unverseifbaren

Einleitung

Als Unverseifbares werden die fettlöslichen Bestandteile bezeichnet, die nach der Verseifung in Wasser unlöslich und in dem zur Bestimmung verwendeten Lösungsmittel löslich sind. Das Unverseifbare enthält natürliche Fettbestandteile (Sterine, Alkohole, Kohlenwasserstoffe) sowie den Fettstoffen fremde organische, bei 100 °C nicht flüchtige Stoffe (Mineralöle), die möglicherweise vorkommen können. Als Lösungsmittel wird Petroläther oder Äthyläther verwendet. Es muß berücksichtigt werden, daß die mit den beiden Lösungsmitteln erzielten Ergebnisse meistens differieren und daß mit Äther die prozentual höheren Werte gefunden werden.

Für Olivenöl wurde im Hinblick auf die klimatischen Verhältnisse der Orte, an denen sich die meisten analytischen Laboratorien befinden, Petroläther als das zu verwendende Lösungsmittel anerkannt.

Petroläther-Methode

Geräte

— 150-ml-Kolben mit Rückflußkühler,

— 500-ml-Scheidetrichter,

— Trockenschrank, eingestellt auf 103 °C ± 2 °C.

Reagenzien

— Etwa 2 N alkoholische KOH, in 95 vol.%igem Äthanol. Das Reagenz darf nicht dunkler als strohgelb sein.

— Petroläther, Siedebereich 40 bis 60 °C, Bromzahl niedriger als 1, frei von Rückständen.

Arbeitsvorschrift

5 g Fett werden auf 0,01 g genau in den Kolben eingewogen. Hinzugefügt werden 50 ml der etwa 2 N alkoholischen KOH. Der Rückflußkühler wird aufgesetzt und es wird eine Stunde unter leichtem Sieden erhitzt. Die Heizung wird abgestellt und von oben durch den Kühler werden etwa 50 ml destilliertes Wasser zugegeben und geschüttelt.

Nach der Abkühlung wird kräftig geschüttelt. Dann läßt man bis zur vollständigen Trennung der beiden Phasen stehen und überführt die Seifenlösung in einen zweiten Scheidetrichter. Sollte sich eine Emulsion bilden, ist sie durch Zusatz kleiner Mengen Äthanol oder einer konzentrierten Kaliumhydroxidlösung zu zerstören.

Die Seifenlösung wird noch zweimal mit je etwa 50 ml Petroläther extrahiert. Die drei Petrolätherfraktionen werden in einem Scheidetrichter vereinigt und dreimal mit etwa 50 ml 50 vol.%igen Alkohol gewaschen.

Die Petrolätherlösung wird — gegebenenfalls schrittweise — durch den Auslauf des Scheidetrichters in einen gewogenen 250-ml-Kolben umgefüllt (wobei der Scheidetrichter mit kleinen Mengen Petroläther gespült wird).

Das Lösungsmittel wird unter vorsichtigem Erwärmen im Vakuum entfernt und der Rückstand bei Temperaturen unter 50 °C im Vakuum getrocknet, um unerwünschte oxydative Veränderungen zu vermeiden.

B. **Abtrennung der Sterinfraktion durch Dünnschicht-Chromatographie**

In die Entwicklungskammer wird bis zur Höhe von ca. 1 cm ein Gemisch aus Benzol/Aceton 95 : 5 oder n Heptan/Aceton 85 : 15 (Vol./Vol.) gegeben ; die Kammer wird mit einem Deckel verschlossen und mindestens drei Stunden stehen gelassen, damit sich ein Gleichgewicht zwischen Flüssigkeit und Dampf einstellt. Es wird empfohlen, an der Innenwand der Kammer Filterpapierstreifen zu befestigen, die in das Fließmittel tauchen. Diese Vorsichtsmaßnahme hat den Vorteil, die Laufzeit des Fließmittels um etwa ein Drittel zu verkürzen und die Komponenten gleichmäßiger zu eluieren.

In der Zwischenzeit wird eine 5%ige Chloroformlösung des mit Petroläther extrahierten Unverseifbaren hergestellt. Man entnimmt ca. 0,3 ml dieser Lösung und trägt sie mit der 0,1-ml-Mikrospritze in einem gleichmäßigen kontinuierlichen Streifen auf die Dünnschichtplatte in etwa 1,5 cm Abstand vom unteren Plattenrand auf, und zwar so, daß man am Start einen möglichst schmalen Streifen erhält. Am Rande der Platte werden nach dem üblichen Verfahren einige µl der cholesterinhaltigen Bezugslösung aufgetragen, um den Rf-Wert der Sterinfraktion zu bestimmen.

Die Platte wird in die nach obiger Vorschrift vorbereitete Entwicklungskammer gestellt. Die Temperatur der Umgebung muß etwa 20 °C betragen.

Der Deckel wird geschlossen und es wird entwickelt, bis die Lösungsmittelfront einen Abstand von etwa 1 cm vom oberen Rand der Platte erreicht hat. Die Platte wird aus der Entwicklungskammer genommen und das Lösungsmittel im Warmluftstrom verdampft.

Die Zonen werden sichtbar gemacht, indem man die Platte gleichmäßig und vorsichtig mit der alkoholischen Lösung des Natriumsalzes des 2',7'-Dichlorfluoresceins besprüht. Die Platte wird im UV-Licht betrachtet und die Lage der Sterine mit Hilfe des Cholesterinfleckens der Bezugslösung bestimmt.

Die Sterinzone wird mit Hilfe eines Metallspatels abgekratzt. Das abgetrennte Kieselgel wird in ein 50-ml-Becherglas mit 15 ml warmem Chloroform gegeben, gerührt, vollständig auf den Gasfiltertiegel gegeben und filtriert. Das Filter wird dreimal mit je 15 ml warmem Chloroform gewaschen und das Filtrat in einem 100-ml-Kolben gesammelt.

Die Chloroformlösung wird auf 4-5 ml eingeengt und in ein zuvor gewogenes Zentrifugenglas mit Schliffstopfen gefüllt. Durch vorsichtiges Erwärmen im Stickstoffstrom wird das Lösungsmittel bis zur Trockene eingedampft und die so gewonnene Sterinfraktion gewogen.

C. **Analyse der Sterine durch Gas-Chromatographie**

1. *Herstellung der Trimethylsilyläther (TMSÄ)*

Je mg Sterin werden 0,02 ml des Reagens für die Silanisierung, bestehend aus einem Gemisch aus Pyridin-Hexamethyldisilazan-Trimethylchlorsilan 9/3/1 (Vol./Vol./Vol.) in das Zentrifugenglas gegeben, wobei jede Spur von Feuchtigkeit zu vermeiden ist. Das Zentrifugenglas wird etwa 30 Minuten lang in den Exsikkator gestellt, dann geschlossen und einige Minuten zentrifugiert. Für die nachfolgende Analyse wird die überstehende Lösung benutzt.

2. *Arbeitsbedingungen für die gaschromatische Analyse*

Säulentemperatur : 220 bis 250 °C

Temperatur des Einspritzsystems, wenn es gesondert beheizt werden kann : 20 bis 40 °C höher als die Säulentemperatur.

Stickstoffstrom : 30-60 ml pro Minute.

Den Detektorenanschluß lösen und neue Säulen unter den vorgenannten Bedingungen in 16-24 Stunden zur Einstellung eines Gleichgewichts bringen. Detektor anschließen, Flamme anzünden und Wasserstoff-, Sauerstoff- oder Luftstrom so einstellen, daß eine geeignete Flammenhöhe und Empfindlichkeit erreicht werden. Den Schreiber einschalten und einen geeigneten Papiervorschub einstellen ; Nullpunkt und Meßbereich einjustieren. Ist die Grundlinie stabil, so ist das Gerät einsatzbereit.

3. *Empfindlichkeitstest*

Von der Lösung für den Empfindlichkeitstest werden 5 ml entnommen, das Lösungsmittel verdampft, und es wird dann wie unter 1. beschrieben fortgefahren. Eingespritzt werden 0,1 bis 0,2 µl der Lösung. Auf dem Chromatogramm darf nur ein Cholesterin-Peak erscheinen.

Der Meßbereich ist so einzuregulieren, daß fast die gesamte Breite des Schreibers ausgenutzt wird.

4. Von der Testlösung für die Peakauflösung werden 5 ml entnommen, das Lösungsmittel verdampft und es wird wie unter 1 beschrieben fortgefahren.

   0,1 bis 0,2 µl der so hergestellten Lösung (TMSÄ) werden eingespritzt. Auf dem Chromatogramm müssen die Peaks von Cholesterin, Brassicasterin, Campesterin und β-Sitosterin erscheinen. Gemessen werden die Retentionsstrecken der Peaks (Abstand vom Einspritzpunkt bis zum Maximum des Peaks) — d_{CH} für Cholesterin d_B für Brassicasterin, d_C für Campesterin und d_S für β-Sitosterin — sowie die Breite an der Peak-Basis (Abstand zwischen den Schnittpunkten der Wendetangenten an der Vorder- und der Rückseite der Peaks mit der Grundlinie) ω_{CH} für Cholesterin und ω_B für Brassicasterin.

   Die Peakauflösung, ausgedrückt durch die Formel

$$PR = 2\,\frac{(d_B - d_{CH})}{\omega_B + \omega_{CH}}$$

   muß mindestens 1 sein.

   Es werden dann die relativen Retentionszeiten (Cholesterin = 1,00) für Brassicasterin, Campesterin und β-Sitosterin berechnet.

5. *Referenztest*

   5 ml der Lösung für den Referenztest werden entnommen, das Lösungsmittel verdampft und es wird wie unter 1 beschrieben fortgefahren. 0,1 bis 0,2 µl der so hergestellten Lösung (TMSÄ) werden eingespritzt. Auf dem Chromatogramm müssen die Peaks von Campesterin, Stigmasterin, β-Sitosterin und Δ 7-Stigmasterin erscheinen. Gemessen werden die Retentionsstrecken der Peaks — und d_C für Campesterin, d_{ST} für Stigmasterin, d_S für β-Sitosterin und d_{ST-7} für Δ 7-Stigmasterin.

   Die relativen Retentionszeiten werden berechnet. Sie betragen etwa für:

Cholesterin	1,0 (ungefähr 15 Minuten)
Brassicasterin	1,1
Campesterin	1,3
Stigmasterin	1,4
β-Sitosterin	1,6 (1)
Δ 7-Stigmasterin	1,8 (2)

6. *Analyse*

   0,1-0,2 µl der zu analysierenden TMSÄ-Lösung werden eingespritzt und das Chromatogramm aufgezeichnet.

D. Ergebnisse

Bei der Ermittlung der Zusammensetzung der analysierten Sterin-Fraktion brauchen Peaks, deren Retentionszeiten von der experimentell ermittelten Zeit der sechs obengenannten Sterine abweichen, nicht berücksichtigt zu werden.

Der prozentuale Gehalt an β-Sitosterin wird durch folgende Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Fläche des β-Sitosterinpeaks}}{\text{Summe der Flächen der sechs Sterinpeaks}} \times 100$$

Der Gehalt an β-Sitosterin darf nicht kleiner als 93 %, bezogen auf die prozentuale Zusammensetzung der Gesamtsterine, sein.

---

(1) Wenn andere Sterine — wie das Δ 5-Avenasterin — unter diesen Bedingungen das gleiche Retentionsvolumen besitzen wie das β-Sitosterin, so werden sie als β-Sitosterin gewertet.

(2) Wenn andere Sterine unter diesen Bedingungen das gleiche Retentionsvolumen besitzen wie das Δ 7-Stigmasterin, so werden sie als Δ 7-Stigmasterin gewertet.

ANHANG IX

ÖLGEHALT DER OLIVENTRESTER

Geräte

— Geeigneter Extraktionsapparat mit 200- bis 250-ml-Kolben,
— Elektrisch beheiztes Bad (Sandbad, Wasserbad usw.) oder Heizplatte,
— Analysenwaage,
— Trockenschrank, eingestellt auf höchstens 80 °C,
— Elektrischer Trockenschrank mit Thermostat, eingestellt auf 103 °C ± 2 °C, der unter Einblasen von Luft oder unter vermindertem Druck betrieben werden kann,
— Mechanische Mühle, leicht zu reinigen, mit der die Trester ohne Erwärmung und ohne merkliche Verringerung ihres Gehalts an Wasser und Öl zerkleinert werden können,
— Extraktionshülse und Watte oder Filterpapier, frei von mit Hexan extrahierbaren Stoffen,
— Exsikkator,
— Sieb, Maschendurchmesser 1 mm,
— Siedesteinchen, zuvor getrocknet.

Reagenzien

— technisches n-Hexan ; Rückstand bei vollständiger Verdampfung unter 0,002 g/100 ml.

ARBEITSVORSCHRIFT

Vorbereitung der Probe

Die Probe wird, wenn nötig, in der zuvor gut gereinigten mechanischen Mühle so weit gemahlen, daß die Teilchen vollständig das Sieb passieren können.

Etwa ein Zwanzigstel der Probe ist zur Reinigung der Mühle zu benutzen ; dieses Mahlgut ist zu verwerfen. Der Rest ist fein zu mahlen, das Mahlgut aufzufangen, sorgfältig zu mischen und unverzüglich zu analysieren.

Untersuchungsprobe

Etwa 10 g der Probe werden nach dem Mahlen auf 0,01 g genau für die Untersuchung abgewogen.

Vorbereitung der Extraktionshülse

Die Probe wird in die Hülse gegeben und diese mit einem Wattebausch verschlossen. Bei Verwendung von Filterpapier wird das Mahlgut darin eingeschlagen.

Vortrocknung

Wenn die Trester sehr feucht sind (Gehalt an Wasser und flüchtigen Stoffen größer als 10 %), ist vorzutrocknen, wobei die gefüllte Hülse (bzw. das Filterpapier) so lange wie nötig in den auf höchstens 80 °C geheizten Trockenschrank gestellt wird, um den Gehalt an Wasser und flüchtigen Stoffen auf unter 10 % zu senken.

Vorbereitung des Kolbens

Der Kolben, der 1 bis 2 Siedesteinchen enthält und zuvor im Trockenschrank bei 103 °C ± 2 °C getrocknet und danach mindestens 1 Stunde lang im Exsikkator abgekühlt wurde, wird auf 1 mg genau gewogen.

Erste Extraktion

Die Hülse (bzw. das Filterpapier) mit der Probe wird in den Extraktionsapparat gestellt, die benötigte Menge Hexan in den Kolben gegeben, der Kolben an den Extraktionsapparat angeschlossen und das Ganze auf das elektrische Heizbad gestellt. Die Heizung ist so einzustellen, daß der Rückfluß mindestens 3 Tropfen in der Sekunde beträgt (mäßiges, nicht heftiges Sieden).

Nach 4stündiger Extraktion läßt man abkühlen. Die Hülse wird aus dem Extraktionsapparat genommen und in einen Luftstrom gestellt, um den größten Teil des Lösungsmittels, mit dem sie durchtränkt ist, zu entfernen.

Zweite Extraktion

Die Hülse wird in die Mikrokugelmühle entleert und es wird so fein wie möglich gemahlen. Das Mahlgut wird quantitativ in die Hülse zurückgegeben und diese wieder in den Extraktionsapparat gestellt.

Es wird nochmals 2 Stunden extrahiert, wobei der die erste Extraktion enthaltende Kolben verwendet wird.

Die im Extraktionskolben enthaltene Lösung muß klar sein. Wenn nicht, ist sie über Filterpapier zu filtrieren, wobei der erste Kolben und das Filterpapier mehrmals mit Hexan gewaschen werden. Das Filtrat und die Waschflüssigkeit werden in einem zweiten, zuvor getrockneten und auf 1 mg abgewogenen Kolben aufgefangen.

Entfernung des Lösungsmittels und Wiegen des Extrakts

Durch Destillieren auf dem elektrischen Heizbad wird der größte Teil des Lösungsmittels entfernt. Die letzten Lösungsmittelspuren werden durch 20minütiges Erhitzen des Kolbens im Trockenschrank bei 103 °C ± 2 °C beseitigt. Die Beseitigung der Lösungsmittelreste wird durch zeitweiliges Einführen eines Luftstromes oder besser eines Inertgasstromes oder durch Arbeiten unter vermindertem Druck erleichtert.

Den Kolben läßt man wenigstens 1 Stunde im Exsikkator abkühlen und wiegt ihn dann auf 1 mg genau.

Danach wird der Kolben erneut 10 Minuten unter den gleichen Bedingungen erhitzt, im Exsikkator abgekühlt und gewogen.

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen der zwei Wägungen darf höchstens 10 mg betragen. Wenn nicht, ist erneut 10 Minuten zu erhitzen, dann wieder abkühlen zu lassen und zu wiegen, bis der Gewichtsunterschied höchstens 10 mg beträgt. Das letzte Gewicht des Kolbens wird notiert.

Für jede Untersuchung werden mit der gleichen Probe zwei Bestimmungen durchgeführt.

ERGEBNISSE

Berechnung und Formel

a) Der Extrakt des Rohproduktes läßt sich in Gewichtsprozenten durch nachstehende Formel berechnen :

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

Dabei sind : S = Gewichtsprozente des Extraktes des Rohprodukts,
m_0 = Gewicht der Untersuchungsprobe in g,
m_1 = Gewicht des Extraktes nach der Trocknung in g.

b) Der Extrakt, bezogen auf den *Trockenstoff*, läßt sich berechnen durch die Formel :

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{Extrakt in \% Fett bezogen auf den Trockenstoff}$$

Dabei sind : S = Gewichtsprozente des Extraktes des Rohprodukts (vgl. a)),
U = sein Gehalt an Wasser und flüchtigen Stoffen.

Wiederholbarkeit

Die Differenz zwischen den Ergebnissen von zwei gleichzeitig oder schnell nacheinander von ein und demselben Analytiker vorgenommenen Bestimmungen darf nicht mehr als 0,2 g Hexan-Extrakt je 100 g Probe betragen.

Andernfalls ist die Analyse mit zwei weiteren Untersuchungsproben zu wiederholen. Liegt die Differenz wieder über 0,2 g, so ist als Ergebnis das arithmetische Mittel aus allen vier Bestimmungen zu nehmen.