KOMMISSIONENS FORORDNING (EØF) Nr. 1058/77

af 18. maj 1977

om særlige kendetegn for olivenolier og visse varer, der indeholder olivenolie, og om ændring af nomenklaturen i den fælles toldtarif for så vidt angår olivenolie

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning nr. 136/66/EØF af 22. september 1966 om oprettelse af en fælles markedsordning for fedtstoffer (1), senest ændret ved forordning (EØF) nr. 1707/73 (2), særlig artikel 13, stk. 4 og artikel 18, stk. 3,

under henvisning til Rådets forordning nr. 162/66/EØF af 27. oktober 1966 om samhandelen med fedtstoffer mellem Fællesskabet og Grækenland (3), særlig artikel 3, stk. 4 og 9,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 443/72 af 29. februar 1972 om de importafgifter, der finder anvendelse på raffineret olivenolie og visse olivenholdige varer (4), særlig artikel 8, og

ud fra følgende betragtninger:

For øjeblikket henhører alle jomfruolier under underposition 15.07 A II a) i den fælles toldtarif; som følge heraf er der fastsat en enkelt importafgift for disse varer; for at importafgiften skal kunne virke efter hensigten, bør den fastsættes efter de forskellige typer jomfreeolier, og der bør derfor sondres mellem olivenolierne alt efter deres særlige fysisk-kemiske kendetegn nomenklaturen i den fælles toldtarif bør derfor tilpasses:

den toldnomenklatur, som følger af anvendelsen af forordning nr. 136/66/EØF, er anført i den fælles toldtarif, der er bilag til forordning (EØF) nr. 950/68 (5), senest ændret ved forordning (EØF) nr. 874/77 (6);

for at sikre, at systemet med importafgifter ved indførsel af presserester af oliven virker korrekt, bør der fastsættes en fælles metode til kontrol af disse varers olieindhold;

Kommissionens forordning (EØF) nr. 618/72 af 29. marts 1972 om særlige kendetegn for olivenolier og visse varer, der indeholder olivenolie (7), er ændret flere gange, særlig ved forordning (EØF) nr. 3366/75 (8); i betragtning af de nye ændringer er det fundet belejligt at ophæve den pågældende forordning og optage samtlige bestemmelser i en ny forordning;

de i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Forvaltningskomiteen for Fedtstoffer —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

1. Som olivenolie betragtes i henhold til underposition 15.07 A i den fælles toldtarif kun olie, som udelukkende er fremstillet af oliven, dog ikke reesterificeret olivenolie, og blandinger af olivenolie med anden olie.

Konstatering af tilstedeværelsen af reesterificeret olie eller anden olie foretages i overensstemmelse med de i bilag VII henholdsvis VIII anførte metoder.

2. Til underposition 15.07 A I a), 15.07 A I b) og 15.07 A I c) i den fælles toldtarif henføres olier, som har de i bilag I, pkt. 1, 2 og 3 anførte karakteristika. Til bestemmelse af ovennævnte karakteristika anvendes de i bilag IV, V og VI beskrevne metoder.

3. Til underposition 15.07 A II a) i den fælles toldtarif henføres olier, som har de i bilag I, pkt. 4, anførte karakteristika.

4. Underposition 15.17 A i den fælles toldtarif omfatter ikke varer fra position 15.17, som har de i bilag II nævnte karakteristika.

Artikel 2

1. Indholdet af olivenolie i oliekager og andre restprodukter fra udvinding af olivenolie, som henføres til underposition 23.04 A, bestemmes i overensstemmelse med den metode, som er anført i bilag IX.

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

2. Det i stk. 1 omhandlede indhold af olivenolie udtrykkes i et procenttal, der angiver oliens vægt i forhold til vægten af tørstoffet.

Artikel 3

Den fælles toldtarif, der er bilag til forordning (EØF) nr. 950/68, ændres således :

1. I supplerende bestemmelse 1 til kapitel 15 erstattes »15.07« med »15.07 D«.

2. De supplerende bestemmelser 2, 3 og 4 til kapitel 15 erstattes af de supplerende bestemmelser 2, 3 og 4 i bilag III til nærværende forordning.

3. Pos. 15.07 A affattes således :

Position i den fælles toldtarif		Zollsatz	
		Autonom % eller importafgift (I)	Bundet %
1	2	3	4
15.07	A. Olivenolie		
	I. Ikke behandlet		
	a) Jomfruolie	20 (I)	—
	b) Bomolie	20 (I)	—
	c) Andre varer	20 (I)	—
	II. I andre tilfælde		
	a) Fremkommet ved behandling af olier henhørende under pos. 15.07 A I a) eller 15.07 A I b), også blandet med jomfruolie.	20 (I)	—
	b) Andre varer	20 (I)	—

Artikel 4

I samtlige fællesskabsakter, hvor der er henvist til underposition 15.07 A II og 15.07 A I a) og b) i den fælles toldtarif, skal disse henvisninger, ifølge den pågældende vares karakteristika, betragtes som omhandlende henholdsvis underposition 15.07 A I a), b) og c) samt 15.07 A II a) og b) i den fælles toldtarif.

Artikel 5

Kommissionens forordning (EØF) nr. 618/72 af 29. marts 1972 ophæves.

Artikel 6

Denne forordning træder i kraft på treogfyrretyvendedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende.*

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 18. maj 1977.

På Kommissionens vegne

Finn GUNDELACH

Næstformand

BILAG

Indholdsfortegnelse

		Side
BILAG I :	Karakteristika for olivenolier	9
BILAG II :	Varer henhørende under pos. 15.17 A	10
BILAG III :	Supplerende bestemmelser nr. 2, 3 og 4 til kapitel 15 i den fælles toldtarif	10
BILAG IV :	I. Behandling af prøven med aktiveret aluminiumoxid	12
	II. Neutralisation og blegning af olivenolie i laboratoriet	12
BILAG V :	Bestemmelse af olie af presserester i olivenolier	14
	A. Den såkalde Bellier-Metode	14
	B. Den såkaldte Vizern-metode, modificeret	14
BILAG VI :	Bestemmelse af sæbe til påvirkning af alkaliindhold	16
BILAG VII :	Bestemmelse af re-esterificerede olier	16
BILAG VIII :	Bestemmelse af tilstedeværelsen af andre olier i olivenolie ved analyse af fedtstoffernes sterolfration	20
BILAG IX :	Metode til bestemmelse af olieindhold i presserester af oliven	24

BILAG I

KARAKTERISTIKA FOR OLIVENOLIER

1. Som jomfruolie i henhold til pos. 15.07 A I a) i den fælles toldtarif betragtes naturlig olivenolie, som udelukkende er udvundet ved mekaniske processer, herunder presning, men ikke blandinger med olivenolie, udvundet på anden måde, og som har følgende karakteristika :

   a) Et indhold af frie fedtsyrer, beregnet som oliesyre, på højst 3 vægtprocent

   b) Extinktionskoefficient K_{270} (absorption ved en lagtykkelse på 1 cm af en opløsning af 1 g olie pr. 100 ml isooctan (2,2,4-trimethylpentan) ved en bølgelængde på 270 nm), der ikke er over 0,25 og som efter behandling af olieprøven med aktiveret aluminiumoxid ikke er over 0,11.

   c) Variation i extinktionskoefficienten i bølgelængdeområder omkring 270 nm på ikke over 0,01.

   Denne variation defineres ved :

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

   K_m er extinktionskoefficienten for de i området omkring 270 nm liggende bølgelængder, som ligger i maksimum af absorptionskurven.

   K_{m-4} og K_{m+4} er extinktionskoefficienterne for bølgelængder, der ligger henholdsvis 4 nm højere eller lavere end ved K_m.

   d) Negative reaktioner efter Bellier-methoden og Vizern-methoden, modificeret, ved fremgangsmåderne i bilag V, pkt. A og B.

   e) Negativ reaktion for sæbe efter fremgangsmåden i bilag VI.

2. Som bomolie i henhold til pos. 15.07 A I b) i den fælles toldtarif betragtes, uanset indholdet af frie fedtsyrer, olivenolie med følgende karakteristika :

   a) En extinktionskoefficient K_{270}, der er over 0,25, og som efter behandling med aktiveret aluminiumoxid ikke er over 0,11. Visse olier med et indhold af frie fedtsyrer udtrykt som oliesyre på over 3 % kan efter behandling med aktiveret aluminiumoxid have en extinktionskoefficient på mere end 0,11. I så fald skal de efter neutralisation og blegning i laboratoriet i overensstemmelse med metoder i bilag IV have følgende karakteristika :

   — En extinktionskoefficient K_{270} på ikke over 1,10 ;

   — En variation i extinktionskoefficienten i bølgelængeområdet omkring 270 nm på over 0,01, men ikke over 0,16.

   b) Negative reaktioner efter Bellier-metoden og Vizern-metoden, modificeret, ved fremgangsmåderne i bilag V, pkt. A og B.

   c) Negativ reaktion for sæbe efter fremgangsmåden i bilag VI.

3. Til pos. 15.07 A I c) i den fælles toldtarif henføres olier, bl.a. »olie af presserester«, der har følgende karakteristika :

   a) Indhold af fri fedtsyrer, udtrykt som oliesyre, på over 3 vægtprocent.

   b) Positiv reaktion efter Bellier-metoden og/eller Vizern-metoden, modificeret, ved fremgangsmåden i bilag V, pkt. A og B.

   c) Negativ reaktion for sæbe efter fremgangsmåden i bilag VI.

4. Til pos. 15.07 A II a) i den fælles toldtarif henføres olivenolie, der er fremkommet ved behandling af olivenolier udvundet af olier henhørende under pos. 15.07 A I a) eller 15.07 A I b), også blandet med jomfruolie, og som har følgende karakteristika :

   a) Indhold af frie fedtsyrer, beregnet som oliesyre, på højst 3 vægtprocent.

   b) Positiv reaktion for sæbe efter fremgangsmåden i bilag VI, eller

— Extinktionskoefficient K_{270} på over 0,25 men ikke over 1,10, og som efter behandling af olieprøven med aktiveret aluminiumoxyd er over 0,11.

— Variation i extinktionskoefficienten i bølgelængdeområdet omkring 270 nm på over 0,01 men ikke over 0,16.

Denne variation defineres ved :

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

K_m er extinktionskoefficienten for de i området omkring 270 nm liggende bølgelængder, som ligger i maksimum af absorptionskurven.

K_{m-4} og K_{m+4} er ekstinktionskoefficienterne for bølgelængder, der ligger henholdsvis 4 nm højere eller lavere end ved K_m.

c) Negativ reaktion efter Bellier-metoden og Vizern-metoden, modificeret, ved fremgangsmåden i bilag V, pkt. A og B.

BILAG II

VARER HENHØRENDE UNDER POS. 15.17 A

Pos. 15.17 A omfatter ikke :

a) Restprodukter fra behandlingen af fedtstoffer og fede olier, som indeholder olie, hvis jodtal efter Wijs' metode uden katalysator er under 70 eller over 100.

b) Restprodukter fra behandlingen af fedtstoffer og fede olier, som indeholder olie, hvis jodtal er mellem 70 og 100, men hvor arealet under den peak, der svarer til retentionsvolumenet (retentionstiden) for beta-sitosterol og som er bestemt i overensstemmelse med bilag VIII, udgør mindre end 93 % af summen af arealerne under samtlige sterolpeaks.

BILAG III

SUPPLERENDE BESTEMMELSER NR. 2, 3 OG 4 TIL KAPITEL 15 I DEN FÆLLES TOLDTARIF

2. A. Som olivenolie (pos. 15.07 A) betragtes kun olie, som udelukkende er fremstillet af oliven, bortset fra re-esterificeret olivenolie og blandinger af olivenolie med anden olie.

B. Som ikke-behandlet olivenolie betragtes olier med de karakteristika, der er anført under pkt. I — III.

I. Som jomfruolie (pos. 15.07 A I a)) betragtes naturlig olivenolie, som udelukkende er udvundet ved mekaniske processer, herunder presning, bortset fra blandinger med olivenolie, udvundet på anden måde, og som har følgende karakteristika :

a) Et indhold af frie fedtsyrer, beregnet som oliesyre, på højst 3 vægtprocent.

b) Extinktionskoefficient K_{270} (absorption ved en lagtykkelse på 1 cm af en opløsning af 1 g olie pr. 100 ml isooctan (2,2,4-trimethylpentan) ved en bølgelængde på 270 nm) der ikke er over 0,25 og som efter behandling af olieprøven med aktiveret aluminiumoxid ikke er over 0,11.

c) Variation i extinktionskoefficienten i bølgelængdeområdet omkring 270 nm på ikke over 0,01.

Denne variation defineres ved :

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

K_m er extinktionskoefficienten for de i området omkring 270 nm liggende bølgelængder, som ligger i maksimum af absorptionskurven.

K_{m-4} og K_{m+4} er extinktionskoefficienterne for bølgelængder, der ligger henholdsvis 4 nm højere eller lavere end ved K_m.

d) Negative reaktioner efter Bellier-metoden og Vizern-metoden, modificeret.

e) Negativ reaktion for sæbe.

II. Som bomolie (pos. 15.07 A I b)) uanset indholdet af frie fedtsyrer, olivenolie med følgende karakteristika :

a) En extinktionskoefficient K_{270}, der er over 0,25 og som efter behandling med aktiveret aluminiumoxid ikke er over 0,11. Visse olier med et indhold af frie fedtsyrer udtrykt som oliesyre på over 3 % kan efter behandling med aktiveret aluminiumoxid have en extinktionskoefficient K_{270} på over 0,11. I så fald skal de efter neutralisation og blegning i laboratoriet have følgende karakteristika :

— En extinktionskoefficient K_{270} på ikke over 1,10.

— En variation i extinktionskoefficienten i bølgelængdeområdet omkring 270 nm på over 0,01, men ikke over 0,16.

b) Negative reaktioner efter Bellier-metoden og Vizern-metoden, modificeret.

c) Negativ reaktion for sæbe.

III. Til pos. 15.07 A I c) henføres olier, bl.a. »olie af presserester«, der har følgende karakteristika :

a) Indhold af frie fedtsyrer, udtrykt som oliesyre, på over 3 vægtprocent.

b) Positiv reaktion efter Bellier-metoden og/eller Vizern-metoden, modificeret.

c) Negativ reaktion for sæbe.

C. Til pos. 15.07 A II a) henføres olivenolie, der er fremkommet ved behandling af olivenolier udvundet af olier henhørende under pos. 15.07 A I a) eller 15.07 A I b), også blandet med jomfruolie, og som har følgende karakteristika :

a) Indhold af frie fedtsyrer, beregnet som oliesyre, på højst 3 vægtprocent.

b) Positiv reaktion for sæbe, eller :

— Extinktionskoefficient K_{270}, på over 0,25 men ikke over 1,10 og som efter behandling af olieprøven med aktiveret aluminiumoxyd er over 0,11, og

— Variation i extinktionskoefficienten i bølgelængdeområdet omkring 270 nm på over 0,01, men ikke over 0,16.

Denne variation defineres ved :

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

K_m er extinktionskoefficienten for de i området omkring 270 nm liggende bølgelængder, som ligger i maksimum af absorptionskurven.

K_{m-4} og K_{m+4} er extinktionskoefficienterne for bølgelængder, der ligger henholdsvis 4 nm højere eller lavere end ved K_m.

c) Negative reaktioner efter Bellier-metoden og Vizern-metoden, modificeret.

3. Pos. 15.17 A omfatter ikke :

a) Restprodukter fra behandlingen af fedtstoffer og fede olier, som indeholder olie, hvis jodtal efter Wijs' metode uden katalysator er under 70 eller over 100.

b) Restprodukter fra behandlingen af fedtstoffer og fede olier, som indeholder olie, hvis jodtal er mellem 70 og 100, men hvor arealet under den peak, der svarer til retentionsvolumenet (retentionstiden) for beta-sitosterol og som er bestemt efter bilag VIII til den i punkt 6 nedenfor nævnt forordning, udgør mindre end 93 % af summen af arealerne under samtlige sterolpeaks.

4. Til bestemmelse af ovennævnte karakteristika anvendes de i bilagene til forordning (EØF) nr. 1058/77 beskrevne analysemetoder.

BILAG IV

I. BEHANDLING AF PRØVEN MED AKTIVERET ALUMINIUMOXID

1. Man kommer 30 g basisk aluminiumoxid, der er fremstillet efter den i stykke 2 beskrevne metode, i en kolonne til kromatografi med en diameter på ca. 35 mm og en længde på 450 mm, og som er forsynet med et udløbsrør med diameter ca. 10 mm.

Aluminiumoxidet stampes mekanisk, ved at man forsigtigt lader kolonnen, der holdes vertikalt, falde gentagne gange ned på en træflade. I den således klargjorte kolonne påfyldes der 100 ml af en opløsning på 10 % olie i hexan.

Eluatet opsamles og opløsningsmidlet fordampes i vakuum ved en temperatur under 25° C.

Af den således udvundne olie skal bestemmelsen af extinktionskoefficienten ved 270 nm straks foretages.

2. Man opnår basisk aluminiumoxid med Brockmann's aktivitet I (0 % vand) ved igennem tre timer ved 380-400° C at opvarme basisk aluminiumoxid (til kromatografi) med en kornstørrelse mellem 30 µm og 130 µm (middelværdi 80 µm). man hælder 5 ml destilleret vand i 100 g af dette produkt for at få basisk aluminiumoxid med en Brockmann's aktivitet mellem II og III. Man omrører hyppigt og lader det stå en nat i en hermetisk tillukket beholder.

Kontrol af aluminiumoxidets aktivitet :

30 g basisk aluminiumoxid (der fås på den ovenfor angivne måde) hældes i en kolonne (til kromatografi) med en diameter på ca. 35 mm og en længde på 450 mm. Gennem denne kolonne hældes som angivet i metoden en blanding af 95 % jomfruolie, der har en extinktionskoefficient K_{270} under 0,18, og af 5 % jordnøddeolie, der ved raffineringen er blevet behandlet med blegejord, og som har en extinktionskoefficient på ikke under 4. Hvis blandingen har en extinktionskoefficient på mere end 0,11, er aluminiumoxidet anvendeligt. Hvis der ikke forekommer aluering af de konjugerede triener på denne aluminiumoxid, skal der anvendes et mere tørt aluminiumoxid, efter at der er blevet kontrolleret, om det opfylder kravene i den foregående test.

II. NEUTRALISATION OG BLEGNING AF OLIVENOLIE I LABORATORIET

A. NEUTRALISATION AF OLIE

1. **Apparatur**

— højst 300 ml-bægerglas ;
— laboratoriecentrifuge med 100 ml-reagensglas ;
— 250 ml-bægerglas ;
— 100 ml-kolber ;
— dekantertragt til 1 liter.

2. **Reagenser**

— vandig natriumhydroxydopløsning på 12 % ;
— ætanolopløsning på 1 % af fenolftalin ;
— analyseret heksan ;
— analyseret isopropylalkohol.

3. **Fremgangsmåde**

a) *olier af en surhedsgrad, udtrykt i oliesyre, på under 30 %*

50 g råolie hældes i et højt 300 ml-bægerglas og opvarmes til 65° C i vandbad. Under langsom bevægelse tilsættes en mængde sodiumhydroxid på 12 % svarende til oliens indhold af frie fedtsyrer, med et overskud på 5 %. Omrøringen fortsættes i fem minutter, idet der opretholdes en temperatur på 65° C.

Det hele omhældes i 100 ml-reagensglas til centrifugering og sæbemassen udskilles ved centrifugering. Den dekanterede olie hældes i et 250 ml-bægerglas og vaskes med 50-60 ml destilleret kogende vand, idet det vandholdige lag fjernes ved hjælp af en hævert. Vaskningerne gentages, indtil sporene af sæberester er fuldstændig forsvundet (indtil fenolftaleinets rosa farve er forsvundet).

Olie centrifugeres for at fjerne de små restmængder af vand.

b) *Olier af en surhedsgrad, udtrykt i oliesyre, på over 30 %*

I en demantertragt til en liter hældes 50 g råolie, 200 ml heksan, 100 ml isopropylalkohol, og en så stor mængde natriumhydroxydopløsning på 12 %, som svarer til oliens indhold af frie fedtsyrer, med et overskud på 0,3 %. Der omrøres kraftigt i 1 minut. Derefter tilsættes 100 ml destilleret vand ; der omrøres på ny, og man lader væsken stå.

Efter lagdelingen lader man det nederste lag, der indeholder sæberne, løbe af. Mellem de to lag (olieholdigt foroven og vandholdigt forneden) dannes der ofte et mellemlag, som består af planteslim og uopløselige stoffer, og som ligeledes skal fjernes.

Derefter vaskes heksanopløsningen af syrefri olie med portioner, bestående af 50-60 ml af en opløsning af isopropylalkohol og destilleret vand i forholdet 1 :1 (v/d), indtil fenolftaleinets rosa farve forsvinder. Derpå fjernes heksanet fuldstændigt ved afdestillering i vakuum (for eksempel ved hjælp af en rotationsfordamper).

B. BLEGNING AF DEN NEUTRALISEREDE OLIE

1. **Apparatur**

— 250 ml kolbe med tre slebne halse, der gør det muligt at indsætte :

a) et gradinddelt termometer, der kan aflæses op til 90° C ;
b) et mekanisk røreapparat med 250-300 omdrejninger i minuttet og udstyret til at fungere i vakuum ;
c) et forbindelsesstykke til vakuumpumpen.

— vakuumpumpe udstyret med manometer og i stand til at give residualtryk på 15-30 milibar.

2. **Fremgangsmåde**

I trehalsekolben vejes ca. 100 g af den neutraliserede olie. Termometret og røreapparatet indsættes ; vakuumpumpen tilsluttes og olien opvarmes under omrøring indtil 90° C. Denne temperatur holdes under stadig omrøring, indtil den olie, der skal analyseres, er fuldstændig befriet for sit vandindhold (ca. 30 minutter).

Vakuum brydes og der tilsættes 2 à 3 g aktiveret jord. Vakuum genoprettes, indtil der opnås et residual-tryk på 15-30 milibar, og der omrøres stadig ved en temperatur af 90° C i 30 minutter med ca. 250 omdrejninger i minuttet.

Dernæst filtreres ved varme i et termostatisk reguleret tørreskab (50-60° C).

BILAG V

BESTEMMELSE AF OLIE AF PRESSERESTER I OLIVENOLIER

A. DEN SÅKALDTE BELLIER-METHODE

1. **Apparatur**

— 100 ml-kolbe med tilbagestrømningssvaler,

— 5 ml pipette gradueret i tiendedele,

— varmekilde, der gør det muligt at nå op på en temperatur på omkring 80° C,

— termometer, der måler fra 15 til 60° C.

2. **Reagenser**

— hydro-alkoholisk opløsning af kali (42,5 og KOH opløst i 72 ml destilleret vand, idet dette volumen fyldes op til 500 ml med 95° ethylalkohol,

— ethylalkohol-opløsning, der måler 70°,

— vandig opløsning af eddikesyre 1 + 2 (i volumen), der afpasses således, at 1,5 ml neutraliserer nøjagtig 5 ml af den hydro-alkoholiske opløsning af kaliumhydroxid ved tilstedeværelse af phenolphthalein.

3. **Tilberedning af prøven**

Olien befries for vand ved dekantering og filtrering gennem filtrerpapir ved en temperatur, der er lidt højere end smeltepunktet for visse faste bestanddele, som kunne være udskilt fra det flydende fedtstof.

4. **Fremgangsmåde**

I kolben hældes ca. 1 ml olie tilberedt som angivet i stykke 3. Der tilsættes 5 ml hydroalkoholisk kaliopløsning. Tilbagestrømningssvaleren tilsluttes og væsken koges i 10 minutter under omrøring fra tid til anden. Man lader den afkøle til den omgivende temperatur. Der tilsættes 1,5 ml vandig eddikesyreopløsning og 50 ml ethylalkoholopløsning, der forinden er opvarmet til 50° C. Den blandes under omrøring, termometret anbringes heri og afkøles, idet opløsningens udseende iagttages, så snart den har nået en temperatur på 45° C. Såfremt der dannes et fnugget bundfald ved en temperatur på over 40° C, er reaktionen positiv. Hvis der ikke dannes fnugget bundfald, lader man væsken stå i den omgivende temperatur, som skal være mellem 20 og 22° C i mindst 24 timer og, om fornødent, i 48 timer. Opløsningen iagttages på ny; dannelsen af et fnugget bundfald som suspension i midten af væsken viser ligeledes, at reaktionen er positiv.

Udformning af resultaterne

Positiv eller negativ bestemmelse af olie af presserester (Bellier-metoden).

B. DEN SÅKALDTE VIZERN-METODE, MODIFICERET

Den uforsæbelige del af den olie, der skal analyseres, isoleres, og dens reaktion i alkohol 85° iagttages under visse betingelser.

1. **Apparatur**

1 — 300 ml glaskolber, der er modstandsdygtige over for alkali, og som er forsynet med en tilbageløbssvaler,

2 — 500 ml eller 1000 ml skilletragt,

3 — 100 ml bægerglas,

4 — Reagensglas.

2. **Reagenser**

— Alkoholopløsning af kaliumhydroxid 2N

— Petroleumether

— Ethylalkohol 50 %

— Ethylalkohol 96°, målt med alkoholometer

— Iltet vand, 10 rumfang

— Ethylalkohol 85°, målt med alkoholometer.

3. **Fremgangsmåde**

Ca. 5 g af analyseprøven afvejes i en 300 ml kolbe. Der tilsættes 50 ml alkoholopløsning af kaliumhydroxid 2N. Tilbageløbssvaleren tilsluttes og væsken bringes til svag kogning. Efter en times opvarmning omrøres væsken, den afkøles til 30-35° C og hældes i en skilletragt, idet der anvendes 50 ml destilleret vand.

Kolben vaskes omhyggeligt med 50 ml petroleumether gentagne gange. Petroleumetheren hældes i en skilletragt. Indholdet omrøres kraftigt lidt over et minut. Efter dekantering elimineres den vandige fase, idet den hældes i en anden skilletragt. Der tilsættes yderligere 50 ml petroleumether, der omrøres kraftigt, hvorefter blandingen stilles til hvile. Den vandige fase hældes i en tredje skilletragt og der tilsættes yderligere 50 ml petroleumether. Der omrøres og blandingen stilles til hvile.

I en skilletragt opsamles de etherekstrakter, der stammer fra de forskellige udtrækninger af den uforsæbelige del, og der vaskes mindst tre gange med alkohol 50 % (50 ml hver gang), indtil denne rensevæske ikke mere giver alkalireaktion ved phenolphthalein.

Opløsningen med den uforsæbelige del filtreres i en 300 ml kolbe, filtret vaskes med petroleumether, hvorefter opløsningen fjernes ved destillering. Der tilsættes 10 ml alkohol 96°, og efter delvis opvarmning (ca. 40° C) filtreres der i et 100 ml bægerglas. 300 ml kolben vaskes med 10 ml alkohol 96°, og der filtreres derefter i bægerglasset.

I 100 ml bægerglasset, der indeholder alkoholekstrakterne med den uforsæbelige del, tilsættes 5 ml iltet vand, 10 rumfang; der opvarmes i vandbad indtil fuldstændig fordampning. Endvidere tilsættes 20 ml alkohol 96° og 5 ml iltet vand; der foretages på ny en fuldstændig fordampning.

Bægerglasset fjernes fra vandbadet, og der tilsættes 20 ml alkohol 85°. Der opvarmes forsigtigt i vandbad, idet der navnlig sørges for, at ingen alkohol går tabt, således at koncentrationen ikke formindskes. Det drejer sig om en særdeles vigtig faktor, som ikke må overses.

Filtrering på papir, afkøling og iagttagelse af reaktionen i opløsningen efter en time, derefter 4 timer. Såfremt opløsningen efter en time er fuldstændig gennemsigtig, er analysen negativ, dvs. at der ikke er olie af presserester.

Såfremt opløsningen efter en time er uklar, iagttages der på ny 4 timer senere.

Såfremt opløsningen efter 4 timer fortsat er uklar, men der ikke forekommer fnug, er analysen fortsat negativ. Hvis der derimod iagttages fnugdannelser, er analysen positiv, og der er tilstedeværelse af olie af presserester.

Udformning af resultaterne

Bestemmelse af olie af presserester (Vizern-metode, modificeret): positiv eller negativ.

Bemærkninger:

Olivenolie giver en gennemsigtig eller højst en smule mælkefarvet opløsning ved ethvert forsøg. Olie af presserester, ren eller blandet, viser karakteristiske fnug, der holder sig svævende som små skyer, men som aflejrer sig, når væsken har været i ro i flere timer.

BILAG VI

BESTEMMELSE AF SÆBE TIL PÅVISNING AF ALKALIINDHOLD

Princip

Påvisning af alkalisæbe ved hjælp af bromphenolblåt.

Reagenser

— 0,1 % bromphenolopløsning i ethanol 96 % v/v

— Frisk destilleret acetone tilsat 2 % vand v/v.

Acetone med 2 % vand skal give en gullig eller grøngullig farve ved tilstedeværelse af et par dråber af bromphenolblåtopløsningen.

Apparatur

Et 150 mm × 15 mm reagensglas.

Fremgangsmåde

10 ml acetone og 1 dråbe af bromphenolopløsningen hældes i reagensglasset. Opløsningen bør blive gullig. Sker dette ikke, skylles glasset og proppen med acetone indtil den blå farve forsvinder. Der hældes 10 g olie i glasset, der lukkes med den rene prop, hvorefter væsken omrøres og stilles til hvile. Såfremt det øverste acetonelag bliver blåt, er det tegn på, at der er sæbe til stede.

Udformning af resultatet

Resultatet udtrykkes som positivt eller negativt.

BILAG VII

BESTEMMELSE AF REESTERIFICEREDE OLIER

Metoden har til formål i olier og fedtstoffer at bestemme sammensætningen af den fedtsyrefraktion, som forestres i glycerols 2-stilling (ß-stilling eller intern stilling) idet reesterificerede olier indeholder mere palmitinsyre end ikke-reesterificerede olier.

Princip :

Denne metode hviler på en specifik og partiel hydrolyse af triglyceriderne af pankreaslipasen med en foretrukken dannelse af mono-2 glycerider. Denne hydrolyse fører til en blanding, som ved siden af de ikke hydrolyserede triglycerider indeholder diglycerider, mono-2 glycerider og frie fedtsyrer. Denne blanding fraktioneres gennem tyndtlagskromatografi og monoglyceriderne isoleres. Disse monoglycerider methanoliseres, og de fremkomne methylestere analyseres ved hjælp af gaskromatografi.

Det analyserede produkt anses som værende tilsat reesterificeret olie, når palmitinsyreandelen i 2-stillingen for triglycerider er større end 2 %.

1. **Udstyr**

— 500 ml skilletragt,

— kolonne af glas til kromatografi, indre diameter 13 mm, længde 400 mm, udstyret med en plade af sintret glas og en hane,

— 250 ml bredhalset kolbe,

— 100 ml kolbe,

— 10 ml centrifugeglas, med slebet prop,

— 1 ml injektionssprøjte, forsynet med en tynd nål,

— 25 ml kolbe med en ca. 1 m lang svaler med slebet ansats,
— 50 ml bægerglas,
— 5 ml burette, gradueret i 1/20 ml,
— spreder til tyndlagskromatografi, med glasplader på 20 × 20 cm,
— mikrosprøjte som kan give dråber på 3-4 µl,
— udviklingskar til tyndlagskromatografi,
— rotationsfordamper,
— ovn som kan indstilles til 103° C ± 2° C,
— termostat som er indstillelig mellem 30° C og 45° C med en nøjagtighed på ± 0,5° C,
— elektrisk vibrationsomrører som muliggør en kraftig omrøring af centrifugeglasset,
— pulverisator til tyndlagskromatografi,
— UV-lampe til undersøgelse af de kromatografiske plader,
— laboratorieomrører, som er egnet til knusning og fordeling af heterogene materialer,
— pH-meter,
— aksialomrører,
— ur.

2. **Reagenser**

— Vandig 12 % (m/v) natriumhydroxidopløsning,
— opløsning af 1 % (m/v) af phenolphtalein i 95 % (v/v) ethanol,
— diethyloxid, fri for peroxider,
— isopropylalkohol eller 95 % (v/v) ethylalkohol, p.a.,
— aktiveret aluminiumoxid til kromatografi, neutralt, med Brockmann aktivitet I nyligt aktiveret gennem 2 timer ved 260° C og opbevaret i en ekssikkator,
— hexan eller eventuelt petroleumether (kp. = 30 — 50° C), til kromatografi,
— myresyre 98 % (m/m) minimum,
— pankreaslipase af passende aktivitet (note 1, note 2),
— bufferopløsning: 1 M vandig opløsning af tri-hydroxymethylaminomethan, som er givet pH 8 ved hjælp af 6 N saltsyre (potentiometrisk kontrol),
— 0,1 % (m/v) vandig opløsning af natriumklorat (enzymatisk kvalitet),
— 6 N saltsyreopløsning,
— udviklingsopløsning: hexan eller eventuelt petroleumether/diethyloxid/myresyre 70/30/1 (v/v/v),
— 10 % (m/v) vandig gummi arabicum opløsning,
— 22 % (m/v) vandig calciumchlorid ($CaCl_2$) opløsning,
— 0,2 % (m/v) alkoholopløsning af dichlor-2'-7' fluorescein, let alkaliseret ved tilsætning af en dråbe 1 N natriumhydroxid pr. 100 ml,
— silicium i pulverform, med bindemiddel, kvalitet til tyndlagskromatografi,
— 20 % (m/v) vandig natriumkloratopløsning,
— 0,1 N vandig natriumhydroxid opløsning,
— neutraliseret olie.

3. **Tilberedning af prøven**

Prøve med aciditet mindre end 3 %: direkte neutralisering på aluminiumoxid som beskrevet i 3-2.

Prøve med aciditet større end 3 %: neutralisering ved hjælp af alkali med tilstedeværelse af opløsningsmiddel som beskrevet i 3-1, derefter passage på aluminiumoxid som beskrevet i 3.2.

3.1. *Neutralisering ved hjælp af alkali med tilstedeværelse af opløsningsmiddel*

I en 500 ml skilletragt hældes ca. 10 g rå olie, 100 ml hexan eller eventuelt petroleumether, 50 ml isopropylalkohol eller 95 % ethylalkohol, nogle dråber phenolphtalein-opløsning og en mængde af den 12 % natriumhydroxidopløsning svarende til oliens frie aciditet plus en overskydende mængde på 0,3 %. Der omrøres kraftigt i 1 minut, derefter tilsættes 50 ml destilleret vand, der omrøres igen, og blandingen stilles til hvile.

Efter dekantering elimineres det nederste lag, som indeholder sæberne. Eventuelle mellemliggende lag elimineres (planteslim og uopløselige stoffer), hexanopløsningen af neutraliseret olie vasket med gentagne portioner på 25 eller 30 ml af en isopropylalkohol-opløsning eller ethylalkoholopløsning og destilleret vand 1 : 1 (v/v), indtil phenolphaleinens rosafarvning forsvinder.

Størstedelen af hexanen elimineres ved vakuumdestillation, og olien tørres ved 30 til 40° C i vakuum ved hjælp af en ren nitrogenstrøm, indtil opløsningsmidlet er fuldstændig elimineret.

3.2. *Behandling med aluminiumoxid*

Der fremstilles en suspension af 15 g aktiveret aluminiumoxid i 50 ml hexan eller eventuelt petroleumether, og denne hældes under omrøring i en glaskolonne til kromatografi. Aluminiumoxidet fordeles ligeligt og opløsningsmidlet påfyldes indtil 1-2 mm over absorbantens øverste niveau. I kolonnen hældes omhyggelig en opløsning, som er klargjort ca. 15 minutter i forvejen ved opløsning af 5 g olie i 25 ml hexan eller eventuelt petroleumether, og den samlede mængde væske, som forlader kolonnen, opsamles i en 100 ml kolbe.

Den største del af opløsningsmidlet elimineres ved vakuumdestillation, derefter tørres olien ved 30 til 40° C i vakuum ved hjælp af en rén nitrogenstrøm indtil total elimination af opløsningsmidlet.

4. Tilberedning af pladerne til kromatografi

I en bredhalset 250 ml kolbe anbringes 30 g silicium i pulverform med bindemiddel og 60 ml destilleret vand, og der omrøres, indtil der fremkommer en godt homogen grødet masse. Der afgasses i vakuum ved hjælp af vandpumpe i 1 minut.

Den grødede masse udspredes som normalt på pladerne ved hjælp af sprederen og tykkelsen reguleres til 0,25 mm.

Den ovennævnte mængde grød er tilstrækkelig til klargøring af fem 20 × 20 cm plader.

Pladerne lufttørres i ca. 15 minutter og tørres derefter i varmeskab ved 103° C ± ° C i 2 timer.

De således fremstillede plader opbevares i en ekssikkator.

5. Fremgangsmåde

5.1. *Hydrolyse ved hjælp af pankreaslipase*

I det 10 ml centrifugeglas afvejes ca. 0,1 g af den tilberedte prøve.

Der tilsættes 20 mg lipase og 2 ml bufferopløsning. Der omrøres omhyggeligt og med forsigtighed, derefter tilsættes 0,5 ml af den 0,1 % natriumkloratopløsning og 0,2 ml af calciumchloridopløsningen. Glasset lukkes med den slebne prop, der fastgøres med forsigtighed (idet man undgår at fugte proppen), og glasset sættes straks i en termostat, som er indstillet på 40° C ± 0,5° C, og der omrøres i nøjagtig 1 minut.

Glasset tages ud af termostaten, og der omrøres kraftigt i nøjagtig 2 minutter.

Der afkøles straks under rindende vand, derefter tilsættes 1 ml 6 N saltsyre og 1 ml diethyloxid. Glasset tillukkes, og der omrøres kraftigt. Blandingen stilles til ro, og den øvre organiske fase udtages ved hjælp af sprøjten.

5.2. *Udskillelse af monoglycerider ved hjælp af tyndlagskromatografi*

Ekstratet anbringes på den kromatografiske plade ca. 1,5 cm fra den nederste rand i en fortsat og ensartet stribe, således at der opnås en startlinje, der er så tynd som muligt.

Pladen stilles ind i udviklingskammeret, og der udvikles, indtil opløsningsmidlets front er nået til ca. 1 cm fra pladens øverste kant. Den omgivende temperatur skal være 20° C.

Pladen lufttørres ved varmeskabets temperatur og dichlor-2'-7' fluoresceinopløsningen pulveriseres. Monoglyceridernes bånd (Rf = ca. 0,035) afgrænses i UV-lys, og de afkrasses ved hjælp af en metalspatel (undgå et tage de bestanddele som er forblevet på startlinjen med); sicilium opsamles i 25 ml methyleringskolbe.

Monoglyceriderne omdannes til methylestere ved direkte at behandle det tidligere opsamlede silicium, som beskrevet i den generelle metode til tilberedning af methylestere fra fedtsyrer angivet i punkt 7.3; derefter foretages gaskromatografi af estere, som beskrevet i metoden i punkt 7.4.

På samme prøve bestemmes sammensætningen af de samlede fedtsyrer, idet det er nyttigt at sammenligne med sammensætningen af fedtsyrerne i 2-stilling med henblik på fortolkning af resultaterne.

6. Udforming af resultater

Sammensætningen af fedtsyrerne i 2-stilling beregnes i procent med 1 decimal (note 3).

7. **Noter**

7.1. *Kontrol af lipaseaktiviteten*

Der fremstilles en olieemulsion ved i et passende blandeapparat i ca. 10 minutter at omryste en blanding bestående af 165 ml 10 % gummi arabicumopløsning, 15 g knust is og 20 ml af en i forvejen neutraliseret olie.

I et 50 ml bægerglas anbringes 10 ml af den ovennævnte emulsion, derefter 0,3 ml 20 % natriumchloratopløsning og 20 ml destilleret vand.

Bægerglasset anbringes i en termostat, som er indstillet til 37° C ± 0,5° C, i bægerglasset neddyppes derefter elektroderne fra et pH-meter og en aksialomrører.

Ved hjælp af en 5 ml burette tilsættes dråbe efter dråbe en 0,1 N natriumhydroxidopløsning indtil pH = 8,5.

Der tilsættes et passende volumen af en suspension af lipasepulver i vand (se nedenfor). Så snart pH-meteret viser 8,3 startes uret, og der tilsættes en 0,1 N natriumhydroxidopløsning i et sådant tempo, at pH netop forbliver 8,3. Hvert minut noteres det forbrugte omfang alkaliopløsning.

De fremkomne resultater optegnes i et koordinatsystem med abscissen som tidsakse og ud af ordinaten de mængder af alkaliopløsning i ml, der er forbrugt for at holde pH konstant. Der skal fremkomme en ret linje.

Den førnævnte lipasesuspension er en 1 procent suspension i vand udtrykt i masse. Ved hvert forsøg tages netop en sådan mængde af denne suspension, at i løbet af 4 til 5 minutter netop 1 ml alkaliopløsning forbruges. Normalt kan dette opnås med 1 til 5 mg pulver.

Lipaseenheden defineres som den mængde enzym, der frigør 10 syremikroækvivalenter pr. minut.

Det anvendte pulvers aktivitet A målt i lipaseenheder pr. mg er:

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

V = antal ml 0,1 N natriumhydroxidopløsning pr. minut beregnet ud fra grafen

m = massen af pulverprøven i mg.

Det anvendte lipase skal have en aktivitet mellem 0,8 og 2 lipaseenheder pr. mg.

7.2. *Tilberedning af lipasen*

Der eksisterer i handelen lipase, som har en lipaseaktivitet, der er tilfredsstillende. Det er ligeledes muligt at fremstille den i laboratoriet på følgende måde:

5 kg frisk grisepankreas afkøles til O° C, omliggende fast fedt og bindevæv fjernes, og pankreasen formales i en knivmølle, indtil der fremkommer en flydende pasta. Denne pasta omrøres ved lav temperatur i 4 til 6 timer med 2,5 l vandfrit acetone; derefter centrifugeres. Remanensen ekstraheres 3 gange med samme rumfang acetone, 2 gange med en acetone-diethyloxidblanding 1/1 (v / v) og 2 gange med diethyloxid.

Remanensen vakuumtørres 48 timer, således at der fremkommer et stabilt pulver, som skal opbevares i køleskab.

7.3. *Fremstilling af fedtsyremethylestere*

I henhold til den i bilag VI, afsnit II, i Kommissionens forordning (EØF) nr. 72/77 af 13. januar 1977 (1) om ændring af forordning (EØF) nr. 1470/68 om udtagelse og reduktion af prøver samt om bestemmelse af indholdet af olie, urenheder og fugtighed i olieholdige frø anførte metode.

7.4. *Gasfasekromatografi af fedtsyremethylestere*

I henhold til den i bilag VI, afsnit III, i Kommissionens forordning (EØF) nr. 72/77 anførte metode.

---

(1) EFT nr. L 12 af 15. 1. 1977, s. 11.

BILAG VIII

BESTEMMELSE AF TILSTEDEVÆRELSEN AF ANDRE OLIER I OLIVENOLIE

ANALYSE AF FEDTSTOFFERS STEROLFRAKTION

Princip

Gaskromatografisk analyse af steroler, fremstillet ved tyndtlagskromatografi af den uforsæbelige del, tørret med forsigtighed.

Apparatur

1. Apparatur til tyndtlagskromatografi, omfattende særlig 4 glasplader 20 × 20 × 0,4 cm, 2 på 20 × 5 × 0,4 cm og 1 mikrosprøjte til 0,1 ml;
2. 50 ml bægerglas;
3. porøse filtre, porøsitet 3, diameter 15 mm;
4. 100 ml-kolbe;
5. 10 ml-centrifugeglas med konisk bund og med slebet prop;
6. graduerede 1 ml- og 5 ml-pipetter;
7. gaskromatograf udstyret med en flammeioniseringsdetektor og med en sølv- eller glasinjektor eller et system til direkte indsprøjtning på kolonnen og forbundet med en skriver;
8. kolonne til gaskromatografi af glas eller af rustfrit stål, U- eller spiralformet af 1 à 2 meters længde og med en indre diameter på 3 à 4 mm — stationær fase af silikongummi (af typen methyl (1)), som er stabil indtil mindst 300° C, hvormed der i forholdet 2 til 4 % imprægneres en kalcineret, med syre vasket og silaniseret diatomejord med kornstørrelse 80/100 eller 100/120 mesh;

   Bemærkning: Da visse typer rustfrit stål kan fremkalde fejlagtige resultater på grund af ødelæggelse af sterolerne, anbefales det at bruge glas.
9. mikrosprøjte, der kan dosere mængder på 1,5 eller 10 µl.

Reagenser

1. Chloroform til kromatografi;
2. benzen til kromatografi;
3. heptan;
4. silikagel (for eksempel Kieselgel G);
5. referenceopløsning til kromatografi på plade, bestående af 5 % cholesterol i chloroform;
6. acetone til kromatografi;
7. opløsning på 0,1 % i absolut ætylalkohol af natriumsalt af 2',7'-dichlorfluorescein.
8. pyridin;
9. hexamethyldicilazon;
10. trimethylchlorsilan;
11. opløsning bestemt til følsomhedstesten: 1 mg cholesterol i 1 ml n-pentain;
12. opløsning til undersøgelse af peakopløsningen: 0,9 mg rapsoliephytosteroler og 0,1 mg cholesterol i 1 ml n-pentan. Sterolerne skal være friskt tilberedt efter den metode, der beskrives under punkt A i afsnittet »fremgangsmåden«,
13. opløsning til referencetesten: 1 mg solsikkeoliephytosteroler i 1 ml n-pentan, friskt tilberedt som beskrevet under punkt A i afsnittet »fremgangsmåden«.

Fremstilling af plader til kromatografi

På udsprederen anbringes i rækkefølge en plade 20 × 5 × 0,4 cm, fire plader 20 × 20 × 0,4 cm og en plade 20 × 5 × 0,4 cm. Der hældes 40 g silikagel og ca. 80 ml vand i en bredhalset 500 ml-kolbe. Der omrøres med en glasstang, eventuelt med et mekanisk røreapparat af glas, indtil der fås en

(1) F. eks. SE 30.

homogen suspension. Eventuelle gasser fjernes ved at evakuere ved hjælp af en vandstrålepumpe i mindst et minut. Derefter lægges suspensionen på sprederen, idet tykkelsen reguleres til 0,5 mm, og pladerne belægges med et ensartet lag. Pladerne lufttørres i ca. 15 minutter og tørres derpå i et varmeskab ved 105° C i to timer. De således fremstillede plader opbevares i en ekssikkator i vakuum.

FREMGANGSMÅDE

A. Tilberedning af den uforsæbelige del

Indledning

Ved den uforsæbelige del forstås de stoffer, der er opløselige i fedtstof, og som efter forsæbning er uopløselige i vand men opløselige i den væske, der anvendes til bestemmelse. Den omfatter fedtstoffernes naturlige bestanddele (sterol, alkohol, kulbrinte), samt organiske stoffer, der ikke fordamper ved 100° C (mineralsk olie), som ikke er en del af fedtstofferne, og som disse eventuelt kan indeholde. Som opløsningsvæske anvendes petroleumether eller ethyloxid. Der må tages hensyn til, at resultaterne med de to opløsninger i de fleste tilfælde er forskellige, og at man finder et større procentindhold med ethyloxid. For olivenolie er petroleumether kendt som den opløsning, der skal anvendes, på grund af det klima, de fleste analyselaboratorier ligger i.

Metoden med petroleumether

Apparatur

— Ca. 150 ml kolbe, der kan tilsluttes en tilbageløbssvaler,

— ca. 500 ml skilletragte,

— ovn som kan indstilles til 103° C (± 2° C).

Reagenser

— Ca. 2 N KOH-ethanolopløsning i ethanol 95 % v/v. Reagensen må ikke være mørkere end den strågule farve (se bemærkning II.D.1.1.2).

— Petroleumether, der uddestilleres fra 40 til 60° C, med et bromindeks, der er mindre end 1, og fri for urenheder.

Fremgangsmåde

Med en nøjagtighed på 0,01 g afvejes ca. 5 g af fedtstoffet i kolben. Der tilsættes 50 ml af ca. 2 N KOH-ethanolopløsningen. Tilbageløbssvaleren tilsluttes. Væsken koger svagt i en time. Varmekilden slukkes. Gennem den øverste del af svaleren tilsættes ca. 50 ml destilleret vand og væsken omrøres.

Efter afkøling hældes væsken over i skilletragten og kolben skylles flere gange med i alt ca. 50 ml petroleumether.

Der omrøres kraftigt i et minut.

Væsken stilles til hvile indtil de to faser er fuldstændig adskilt, og den sæbeholdige opløsning opsamles i en anden skilletragt. Såfremt der undtagelsesvis forekommer emulsionsdannelse, skal denne tilintetgøres ved tilsætning af små mængder ethanol eller koncentreret kaliumhydroxid-opløsning.

Den sæbeholdige opløsning uddrages endnu 2 gange, hver gang med ca. 50 ml petroleumether.

De tre petroleumholdige dele samles i samme tragt, og de vaskes 3 gange med ca. 50 ml ethanol 50 % v/v.

Fra tragtens øverste del hældes — om nødvendigt ad flere gange — den mængde, der svarer til petroleumetheren, i en tareret 250 ml kolbe (idet der foretages små skyldninger af tragten med petroleumether).

Opløsningen fjernes ved forsigtig opvarmning i vakuum og affaldet tørres ved en temperatur under 50 C i vakuum for at undgå uønsket iltning.

B. **Udskillelse af sterolfraktionen ved tyndtlagskromatografi**

I udviklingskammeret anbringes normalblandingen af heptan/acetone — 85/15 eller benzol/acetone 95/5 (v/v) op til en højde af ca. 1 cm ; kammeret lukkes ved hjælp af dækslet og man lader blandingen stå i mindst tre timer, således at væske/damp-ligevægt kan opstå. Det tilrådes ligeledes på de indre sider af kammeret at fastgøre strimler af filtrerpapier, nedsænket i væsken. Denne forsigtighedsforanstaltning har den fordel at forkorte væskens vandring med ca. en tredjedel og at få komponenterne til at eluere på en mere ensartet måde.

I mellemtiden fremstilles en opløsning på 5 % af den med petroleumether chloroform udtrukne uforsæbelige del. Ca. 0,3 ml af denne opløsning udtages og anbringes ved hjælp af 0,1 ml-mikrosprøjten på den kromatografiske plade ca. 1,5 cm fra den nederste rand i en fortsat og ensartet stribe, således at der opnås en startlinje, der er så tynd som muligt. Efter den sædvanlige fremgangsmåde anbringes i randen af pladen nogle ml af referenceopløsningen, som indeholder cholesterol, for at kunne bestemme Rf-værdien af sterolfraktionen.

Pladen stilles ind i udviklingskammeret, der er klargjort som ovenfor angivet. Den omgivende temperatur skal være ca. 20° C. Der lukkes med dækslet og udvikles, indtil opløsningsmidlets front er nået til ca. 1 cm fra pladens øverste rand. Pladen tages ud af udviklingskammeret, og man lader opløsningsmidlet fordampe i en varm nitrogenstrøm.

Ved at strøjte jævnt og forsigtigt fremkaldes den alkoholiske opløsning af natriumsalt 2',7'-dichlorfluorescein på pladen. Ved at undersøge pladen i ultraviolet lys bestemmes sterolernes stilling ved hjælp af deres beliggenhed i linje med den cholesterolplet, der fremkommer ved referenceopløsningen. Sterolzonen afkradses ved hjælp af en metalspatel. Den udskilte silikagel hældes i et 50 ml-bægerglas med 15 ml varm chloroform, der omrøres, og den samlede mængde silikagel anbringes på det porøse filter og filtreres.

Filtret vaskes tre gange, hver gang med 15 ml varm chloroform, og filtratet opsamles i en 100 ml-kolbe.

Chloroformopløsningen inddampes til 4 à 5 ml, og hældes i et centrifugeglas, forsynet med en slebet prop, der i forvejen er tareret. Opløsningsmidlet inddampes til tørhed ved en let opvarmning i en nitrogenstrøm, derefter vejes den således frembragte sterolfraktion.

C. **Gaskromatografisk analyse af steroler**

1. *Tilberedning af trimethylsiliethere (TMS)*

For hver mg sterol tilsættes i centrifugeglasset 0,02 ml reagens til silanisering, sammensat af en blanding af pyridin-hexamethyldisilazan-trimethylchlorosilan 9.3.1 (v/v/v), idet ethvert spor af fugtighed omhyggeligt undgås. Centrifugeglasset anbringes i en ekssikkator i ca. 30 minutter, derpå lukkes, og der centrifugeres i nogle minutter. Til den analyse, som derefter skal foretages, udtages den resterende opløsning.

2. *Betingelser for den gaskromatografiske analyse*

Kolonnetemperatur 220 à 250° C.

Temperatur i indsprøjtningssystemet, hvis det opvarmes særskilt : 20 à 40° C over kolonnens temperatur. Nitrogenmængde 30 à 60 ml/min. Detektortilslutningen afbrydes og under disse omstændigheder bringes de nye kolonner i ligevægt i 16 à 24 timer. Detektoren tilsluttes, flammen tændes og hydrogen-, oxygen- eller luftstrømmen reguleres således, at der fås en passende flammehøjde og følsomhed. Skriveren sættes i gang og papiret fremføres med en passende hastighed ; nulpunktet og måleområdet justeres. Hvis grundlinjen er stabil, er apparatet klar til brug.

3. *Følsomhedstest*

Der udtages 5 ml af opløsningen til følsomhedstesten, opløsningsmidlet inddampes, følg fremgangsmåden i 1 ; indsprøjt 0,1 til 0,2 µl opløsning. Kun cholesterol-peaken må vise sig på kromatogrammet.

Måleområdet indstilles således, at næsten hele skriverens udslagsområde udnyttes.

4. *Test af top-opløsning*

Der udtages 5 ml af opløsningen til opløsningstesten. Opløsningen inddampes, følg fremgangsmåden i 1.

Der indsprøjtes 3 à 5 µl af den således tilberedte opløsning (IMS). Peaks af cholesterol, af brassicasterol, af campesterol og af β-sitosterol skal vise sig på kromatogrammet. Derefter måles retentionsafstandene (afstanden fra indsprøjtningspunktet til det højeste punkt på en peak), ω_{CH} for cholesterol, ω_B for brassicasterol, ω_C for campesterol og d_S for β-sitosterol, såvel som bredden ved basis af peak (rententionslængden mellem vendetangenternes skæringspunkter på for- og bagside af peaks med basislinjen), ω_{CH} for cholesterol og ω_B for brassicasterol. Topopløsningen udtrykt i formlen :

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

skal være lig med mindst 1.

De relative retentionstider (cholesterol = 1,00) for brassicasterol, campesterol og β-sitosterol, beregnes.

5. *Referencetest*

Der udtages 5 ml af opløsningen til referencetest, opløsningsmidlet inddampes, følg fremgangsmåden i 1, indsprøjt 0,1 til 0,2 µl af den således tilberedte opløsning (TMS). Peaks af campesterol af stigmasterol af β-sitosterol og Δ 7 stigmasterol skal vise sig på kromatogrammet.

Rententionsafstandene for peaks, d_C for campesterol, d_{ST} for stigmasterol, d_S for β-sitosterol og d_{ST-7} for Δ 7 stigmasterol, måles.

Derefter beregnes de relative retentionstider, som tilnærmelsesvis er :

Cholesterol	1,0 (ca. 15 minutter)
Brassicasterol	1,1
Campesterol	1,3
Stigmasterol	1,4
β-sitosterol	1,6 (1)
Δ 7 stigmasterol	1,8 (2)

6. *Analyse*

Der indsprøjtes 0,1 til 0,2 µl af den TMSE-opløsning af de steroler, der skal analyseres, og kromatogrammet registreres.

D. Udformning af resultaterne

Ved fortolkningen af sammensætningen af den analyserede sterolfraktion må der ikke tages hensyn til de toppe, der har andre retentionstider end dem, der ikke tages hensyn til de toppe, der har andre retentionstider end dem, der eksperimentielt er bestemt for de ovennævnte seks steroler.

Procentindholdet af β-sitosterol følger af formlen :

$$\frac{\text{β-sitosterol toppens areal}}{\text{Summen af de seks sterolpeaks arealer}} \times 100$$

Indholdet af β-sitosterol må ikke være mindre end 93 % i forhold til sammensætningen i % af de samlede steroler.

(1) Såfremt andre steroler under disse betingelser har samme retentionsvolumen som β-sitosterol, tælles de som β-sitosterol.
(2) Såfremt andre steroler under disse betingelser har samme retentionsvolumen som Δ 7 stigmasterol, tælles de som Δ 7 stigmasterol.

BILAG IX

OLIEINDHOLD I PRESSERESTER AF OLIVEN

Apparatur

— Egnet ekstraktionsapparat, forsynet med en 200-250 ml kolbe
— Elektrisk opvarmet bad (sandbad, vandbad, osv.) eller varmeplade
— Analysevægt
— ovn, der er indstillet til højst 80 °C
— Elektrisk ovn med temperaturregulering, der kan indstilles til 103 °C ± 2 °C, og som muliggør luftindblæsning eller vakuum
— Mekanisk mølle, der er let at rengøre, egnet til olivenoliekager, og som er i stand til at male uden opvarmning eller mærkbar reduktion af indholdet af vand, af flygtige stoffer og af stoffer, der kan uddrages ved hjælp af hexan
— Ekstraktionshylster og vat eller filterpapir, fri for substanser, der kan uddrages ved hjælp af hexan
— Ekssikkator
— Sigte med huller på 1 mm i diameter
— Pimpsten i små korn, tørret.

Reagens

Teknisk n-hexan, hvis fordampningsrest ved fuldstændig fordampning er mindre end 0,002 g/100 ml.

FREMGANGSMÅDE

Tilberedning af prøven

Om nødvendigt males analyseprøven i den mekaniske mølle, der skal være omhyggeligt rengjort på forhånd, således at prøven kan reduceres til små partikler, der kan passere sien fuldstændigt.

Ca. en tyvendedel af prøven anvendes til en fuldstændig rengøring af møllen ; denne formalede del bortkastes, og resten males, opsamles og blandes med omhu, hvorefter analysen straks foretages.

Prøvemængde

Der afvejes med 0,01 g nøjagtighed ca. 10 g af analyseprøven til prøvemængde, når formalingen er afsluttet.

Tilberedning af ekstraktionshylstret

Prøvemængden anbringes i hylstret, og dette lukkes med vandsugende vat. Såfremt der anvendes filterpapir, indpakkes prøven i dette papir.

Fortørring

Hvis presseresterne er meget fugtige (indhold af vand og flygtige stoffer på over 10 %), foretages der en fortørring, idet det fyldte hylster (eller filterpapir) anbringes en passende tid i ovnen, der højst kan opvarmes til 80 °C, således at indholdet af vand og flygtige stoffer bringes ned under 10 %.

Tilberedning af kolben

Kolben, der indeholder 1 à 2 pimpstenskorn, og som på forhånd er tørret i ovnen ved en temperatur på 103 °C ± 2 °C og derefter afkølet mindst 1 time i ekssikkatoren, vejes med 1 mg nøjagtighed.

Første ekstraktion

Hylstret (eller filterpapiret), der indeholder prøvemængden, anbringes i ekstraktionsapparatet. Den nødvendige mængde hexan hældes i kolben. Kolben tilsluttes ekstraktionsapparatet, og det hele anbringes i det elektrisk opvarmede bad. Opvarmningen reguleres således, at tilbageløbsmængden udgør mindst 3 dråber i sekundet (moderat, ikke stærk kogning).

Efter 4 timers ekstraktion foretages afkøling. Hylstret udtages af ekstraktionsapparatet og anbringes i en luftstrøm for at fjerne størstedelen af det indeholdte opløsningsmiddel.

Anden ekstraktion

Hylstret tømmes i mikromøllen, og der males så fint som muligt.

Anbring mængdemæssigt blandingen på ny i hylstret og dette i ekstraktionsapparatet.

Ekstraktionen begyndes på ny, og den fortsættes endnu to timer, idet kolben med forrige ekstraktion anvendes.

Den opløsning, der opnås i ekstraktionskolben, skal være gennemsigtig. Såfremt dette ikke er tilfældet, filtreres der på et stykke filterpapir, idet den første kolbe og filterpapiret gentagne gange vaskes med hexan. Filtratet og afvaskningsopløsningen opsamles i en særskilt kolbe, der på forhånd er tørret og vejet med 1 mg nøjagtighed.

Eliminering af opløsning og vejning af ekstraktet

Størstedelen af opløsningsmidlet fjernes ved destillation i elektrisk opvarmet vandbad. De sidste rester af opløsningsmidlet fjernes ved at opvarme kolben i ovnen ved 103 °C ± 2 °C i 20 minutter. Fordampningen fremskyndes enten ved indblæsning af luft eller, bedre, inaktiv gas fra tid til anden eller ved anvendelse af vakuum.

Kolben afkøles i ekssikkatoren i mindst 1 time, og den vejes med 1 mg nøjagtighed.

Der opvarmes på ny i 10 min. under samme forhold, hvorefter kolberne afkøles i ekssikkator og vejes.

Forskellen mellem to vejninger må ikke overstige 10 mg. I modsat fald opvarmes der på ny i perioder på ti minutter med efterfølgende afkøling og vejning, indtil forskellen i masse er højst 10 mg. Den sidste vejning af kolben noteres.

Der foretages to bestemmelser af den samme prøvemængde.

UDFORMNING AF RESULTATER

Beregning og formler

Ekstraktet udtrykt i masseprocent af produktet som leveret er

a) lig med :

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

idet S = masseprocent af produktet som leveret
m_0 = massen i gram af den udtagne prøvemængde
m_1 = massen i gram af ekstraktet efter tørring

Som resultat tages det aritmetiske gennemsnit af de to bestemmelser, såfremt ingen gentagelse af bestemmelsen er nødvendig.

Resultatet udtrykkes med en decimal.

b) Ekstraktet kan udtrykkes i relation til *tørstoffet* ved anvendelse af følgende formel :

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{ekstrakt i \% fedtstof/tørstof}$$

idet S = masseprocent for ekstraktet af produktet som leveret (jf. a))
U = indhold af vand og flygtige stoffer.

Reproducerbarhed

Forskellen mellem resultaterne af de to samtidigt eller umiddelbart efter hinanden af samme analytiker foretagne bestemmelser, må ikke overstige 0.2 g ekstrakt ved hexan for 100 g prøve.

I modsat fald gentages analysen på to andre prøvemængder. Hvis forskellen også denne gang overstiger 0,2 g, tages som resultat det aritmetiske gennemsnit af de fire bestemmelser.