KOMMISSIONENS GENNEMFØRELSESFORORDNING (EU) 2019/1604

af 27. september 2019

om ændring af forordning (EØF) nr. 2568/91 om kendetegnene for olivenolie og olie af olivenpresserester og de i den forbindelse anvendte metoder

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EU) nr. 1308/2013 af 17. december 2013 om en fælles markedsordning for landbrugsprodukter og om ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 922/72, (EØF) nr. 234/79, (EF) nr. 1037/2001 og (EF) nr. 1234/2007 ([1]), særlig artikel 91, stk. 1, litra d), og

ud fra følgende betragtninger:

(1) I Kommissionens forordning (EØF) nr. 2568/91 ([2]) er der fastsat fysisk-kemiske og organoleptiske kendetegn for olivenolie og olie af olivenpresserester samt metoder til bedømmelse af disse kendetegn.

(2) Metoderne og grænseværdierne for oliernes kendetegn opdateres regelmæssigt på grundlag af udtalelser fra sagkyndige på det kemiske område og i overensstemmelse med det arbejde, der udføres i Det Internationale Olivenoleråd (IOC)

(3) For at sikre gennemførelsen på EU-plan af de seneste internationale standarder, der er fastsat af IOC, bør visse analysemetoder, der er fastsat i forordning (EØF) nr. 2568/91, ajourføres.

(4) IOC-varestandarden er blevet ændret for angivelsen af grænseværdien for frie syrer, peroxidtal, organoleptisk vurdering (median for mangler og median for egenskaben frugtagtig) og forskellen mellem ECN42 (HPLC) og ECN42 (teoretisk beregning) for at sikre overensstemmelse med analysemetodens nøjagtighedsværdier.

(5) I henhold til artikel 2a, stk. 5, i forordning (EØF) nr. 2568/91 skal medlemsstaterne kontrollere, om en olivenolieprøve svarer til den anmeldte kategori ved at kontrollere de kendetegn, der er anført i bilag I til nævnte forordning, i en hvilken som helst rækkefølge eller i den rækkefølge, der er fastsat i det beslutningsskema, der er angivet i dens bilag Ib.

(6) I lyset af den seneste udvikling bør tabellerne i bilag Ib til forordning (EØF) nr. 2568/91 og i givet fald tillæggene hertil ajourføres. I lyset af indholdet i bilag Ib er »flowdiagram« et mere passende udtryk end »beslutningsskema«.

(7) I punkt 9.4 i bilag XII til forordning (EØF) nr. 2568/91 defineres medianen for mangler som medianen for den mangel, der opfattes med den største intensitet. I forbindelse med kontrolanalyser og under hensyn til, at forskellige paneler skal vurdere, om olien er i overensstemmelse med normerne, bør det præciseres, at beslutningen om, hvorvidt oliens kendetegn er i overensstemmelse med den anmeldte kategori, udelukkende vedrører værdien for medianen for den væsentligste mangel, uanset dens art.

(8) Forordning (EØF) nr. 2568/91 bør derfor ændres.

(9) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra Komitéen for den Fælles Markedsordning for Landbrugsprodukter —

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

Artikel 1

I forordning (EØF) nr. 2568/91 foretages følgende ændringer:

1) I artikel 2 foretages følgende ændringer:

a) Stk. 1, litra l), affattes således:

»l) til bestemmelse af sammensætningen og indholdet af steroler og til bestemmelse af alkoholforbindelser ved gaskromatografi på kapillarsøjle, metoden i bilag XIX«

([1]) EUT L 347 af 20.12.2013, s. 671.
([2]) Kommissionens forordning (EØF) nr. 2568/91 af 11. juli 1991 om kendetegnene for olivenolie og olie af olivenpresserester og de i den forbindelse anvendte metoder (EFT L 248 af 5.9.1991, s. 1).

b) Stk. 2, tredje afsnit, affattes således:

»Hvis panelet ikke bekræfter den anmeldte kategori med hensyn til de organoleptiske kendetegn, lader de nationale myndigheder eller deres repræsentanter på den berørte parts anmodning straks foretage to kontrolanalyser, som foretages af andre godkendte paneler. Mindst et af panelerne skal være et panel, der er godkendt af den pågældende producentmedlemsstat. De pågældende kendetegn anses for at stemme overens med dem, der er anmeldt, hvis de to kontrolanalyser bekræfter den anmeldte klassifikation. Er dette ikke tilfældet udstedes der, uanset hvilken type mangler, der er konstateret ved kontrolanalyserne, en erklæring om, at klassifikationen ikke svarer til egenskaberne, og den berørte part afholder omkostningerne til kontrolanalyserne.«

2) Artikel 2a, stk. 5, litra b), affattes således:

»b) at analyserne udføres i den rækkefølge, der er fastlagt i flowdiagrammet i bilag Ib, indtil en af beslutningerne i flowdiagrammet træffes.«

3) Tabellen »BILAG Resumé« erstattes af tabellen i bilag I til nærværende forordning

4) Bilag I erstattes af teksten i bilag II til nærværende forordning.

5) Punkt 2.1 i bilag Ia affattes således:

»2.1. Hver basisprøve opdeles i laboratorieprøver, jf. punkt 2.5 i standard EN ISO 5555, og analyseres i den rækkefølge, der fremgår af flowdiagrammet i bilag Ib, eller i en anden vilkårlig rækkefølge.«

6) Bilag Ib erstattes af teksten i bilag III til nærværende forordning.

7) Bilag V udgår

8) Punkt 4.2 i bilag VII affattes således:

»4.2. n-hexan (til kromatografering). Hexan kan erstattes af isooctan (2,2,4-trimethylpentan til kromatografering), såfremt der opnås sammenlignelige nøjagtighedsværdier.«

9) Bilag XII ændres i overensstemmelse med bilag IV til nærværende forordning.

10) Bilag XVII ændres i overensstemmelse med bilag V til nærværende forordning.

11) Bilag XVIII ændres i overensstemmelse med bilag VI til nærværende forordning.

12) Bilag XIX erstattes af teksten i bilag VII til nærværende forordning.

13) Punkt 4.2 i bilag XX affattes således:

»4.2. n-hexan, til kromatografering eller bestemmelse af restkoncentrationer. Hexan kan erstattes af isooctan (2,2,4-trimethylpentan til kromatografering), såfremt der opnås sammenlignelige nøjagtighedsværdier. Opløsningsmidler med et højere kogepunkt end n-hexan fordamper langsommere. De foretrækkes imidlertid grund af hexans toksicitet. Renheden kontrolleres; f.eks. kan restproduktet efter fordampningen af 100 ml opløsningsmiddel kontrolleres.

ADVARSEL — Dampe kan antændes. Holdes væk fra varme, gnister og åben ild. Sørg for, at flasker altid er rigtigt lukket. Sørg for god udluftning under brugen. Undgå akkumulering af dampe, og fjern alle antændelseskilder såsom elvarmeapparater og elektrisk udstyr, der ikke er lavet af ikkebrændbare materialer. Farligt ved indånding, da det kan forårsage skader på nerveceller. Undgå indånding af dampe. Brug om nødvendigt egnet åndedrætsværn. Undgå kontakt med øjne og hud.

Isooctan er en antændelig væske, der udgør en brandfare. Eksplosionsgrænser i luften ligger mellem 1,1 % og 6,0 % (volumenandel). Stoffet er toksisk ved indtagelse og indånding. Anvend et fuldt funktionsdygtigt stinkskab med god ventilation ved håndtering af dette opløsningsmiddel.«

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tyvendedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

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

Udfærdiget i Bruxelles, den 27. september 2019.

På Kommissionens vegne
Jean-Claude JUNCKER
Formand

BILAG I

»*BILAG*

RESUMÉ

Bilag I	Kendetegn for olivenolie
Bilag Ia	Udtagning af prøver af partier af olivenolie eller olie af olivenpresserester leveret i umiddelbare emballager
Bilag Ib	Flowdiagram til kontrol af, om en olivenolieprøve svarer til den anmeldte kategori
Bilag II	Bestemmelse af indholdet af frie fedtsyrer, kold metode
Bilag III	Bestemmelse af peroxidtal
Bilag IV	Bestemmelse af voksindholdet ved gaskromatografi på kapillarkolonne
Bilag VII	Bestemmelse af indholdet af 2-glycerylmonopalmitat i procent
Bilag IX	Spektrofotometrisk undersøgelse ved ultraviolet lys
Bilag X	Bestemmelse af fedtsyremethylestere ved gaskromatografi
Bilag XI	Bestemmelse af indholdet af flygtige halogenerede opløsningsmidler i olivenolie
Bilag XII	Det Internationale Olivenråds metode til organoleptisk bedømmelse af jomfruolier
Bilag XV	Olieindhold i presserester af oliven
Bilag XVI	Bestemmelse af iodtal
Bilag XVII	Metode til bestemmelse af stigmastadiener i vegetabilske olier
Bilag XVIII	Bestemmelse af forskellen mellem det faktiske og det teoretiske indhold af ECN 42-triacylglyceroler
Bilag XIX	Bestemmelse af sammensætningen og indholdet af steroler og alkoholforbindelser ved gaskromatografi på kapillarkolonne
Bilag XX	Metode til bestemmelse af indholdet af voks, fedtsyremethylestere og fedtsyreethylestere ved gaskromatografi på kapillarkolonne
Bilag XXI	Resultaterne af overensstemmelseskontroller, der er udført på olivenolie, jf. artikel 8, stk. 2«

BILAG II

»*ANNEX I*

KENDETEGN FOR OLIVENOLIE

Kvalitetsegenskaber

Kategori	Syreindhold (%) (*)	Peroxidtal (mEq O_2/kg)	K_{232}	K_{268} eller K_{270}	Delta-K	Organoleptisk vurdering		Fedtsyreethylestere (mg/kg)
						Median for mangler (Md) (*)	Median for egenskaben frugtagtig (Mf)	
1. Ekstra jomfruolie	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Jomfruolie	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Bomolie	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (1)	—	—
4. Raffineret olivenolie	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Olivenolie bestående af raffineret olivenolie og jomfruolie	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Rå olie af olivenpresserester	—	—	—	—	—		—	—
7. Raffineret olie af olivenpresserester	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Olie af olivenpresserester	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(1) Medianen for mangler kan være 3,5 eller derunder, hvis medianen for frugtagtig er 0,0.

Renhedsegenskaber

Kategori	Fedtsyresammensætning (1)						Summen af isomerer af transolie-syre (%)	Summen af translinol-syre og isomerer af translino-lensyre (%)	Stigmasta-diener (mg/kg) (2)	Forskel mellem ECN42 (HPLC) og ECN42 (teoretisk beregnet)	2-glycerylmonopalmitat (%)
	Myristin-syre (%)	Linolensyre (%)	Arachin-syre (%)	Eicosensyre (%)	Behenin-syre (%)	syre (%)					
1. Ekstra jomfruolie	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, hvis palmitinsyre i alt ≤ 14,00 % ≤ 1,0 hvis palmitinsyre i alt > 14,00 %
2. Jomfruolie	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, hvis palmitinsyre i alt ≤ 14,00 % ≤ 1,0 hvis palmitinsyre i alt > 14,00 %
3. Bomolie	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9 hvis palmitinsyre i alt ≤ 14,00 % ≤ 1,1 hvis palmitinsyre i alt > 14,00 %
4. Raffineret olivenolie	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, hvis palmitinsyre i alt ≤ 14,00 % ≤ 1,1 hvis palmitinsyre i alt > 14,00 %
5. Olivenolie bestående af raffineret olivenolie og jomfruolie	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9 hvis palmitinsyre i alt ≤ 14,00 % ≤ 1,0 hvis palmitinsyre i alt > 14,00 %
6. Rå olie af olivenpresserester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Raffineret olie af olivenpresserester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Olie af olivenpresserester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

(1) Indhold af andre fedtsyrer (%): palmitinsyre: 7,50-20,00; palmitolsyre: 0,30-3,50; heptadecansyre: ≤ 0,40; heptadecensyre ≤ 0,60; stearinsyre: 0,50-5,00; oliesyre: 55,00-83,00; linolsyre: 2,50-21,00.

(2) Summen af isomerer, der eventuelt kan adskilles på kapillarkolonne.

Kategori	Sterolsammensætning						Steroler i alt (mg/kg)	Erytrodiol og uvaol (%) (**)	Voks (mg/kg) (**)
	Cholesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol (1) (%)	Stigmasterol (%)	App β-sitosterol (2) (%)	Delta-7-stigmastenol (1) (%)			
1. Ekstra jomfruolie	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Jomfruolie	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Bomolie	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (3)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ (3)
4. Raffineret olivenolie	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Olivenolie bestående af raffineret olivenolie og jomfruolie	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Rå olie af olivenpresserester	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (4)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ (4)
7. Raffineret olie af olivenpresserester	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Olie af olivenpresserester	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

(1) Se tillægget til dette bilag.

(2) App β-sitosterol: delta-5,23-stigmastadienol + clerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5 –avenasterol + delta - 5,24-stigmastadienol.

(3) Olier med et voksindhold på mellem 300 mg/kg og 350 mg/kg betragtes som bomolie, hvis det samlede indhold af alifatiske alkoholer er på 350 mg/kg eller derunder, eller hvis indholdet af erytrodiol og uvaol er på 3,5 % eller derunder.

(4) Olier med et voksindhold på mellem 300 mg/kg og 350 mg/kg betragtes som rå olie af olivenpresserester, hvis det samlede indhold af alifatiske alkoholer er på over 350 mg/kg, og hvis indholdet af erytrodiol og uvaol er på over 3,5 %.

Noter:

a) Analyseresultaterne skal anføres med lige så mange decimaler som dem, der er angivet for hvert kendetegn. Sidste ciffer skal forhøjes med en enhed, hvis det følgende ciffer er større end 4.

b) Hvis de fastsatte grænseværdier overskrides for blot ét kendetegn, klassificeres olien i en anden kategori eller erklæres for ikke-overensstemmende med henblik på denne forordning.

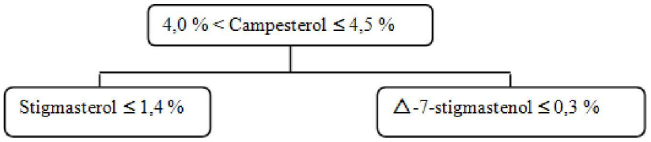
c) Ved bomolie kan begge kvalitetskendetegn med en asterisk (*) samtidig afvige fra de grænseværdier, der er fastlagt for denne kategori.

d) Hvis et kvalitetskendetegn er mærket med to asterisker (**), betyder det for råolie af olivenpresserester, at alle grænseværdier ikke behøver være opfyldt samtidig. Ved olie af olivenpresserester og raffineret olie af olivenpresserester kan en af de gældende grænseværdier afvige fra de pågældende værdier.

Tillæg

Beslutningsskemaer

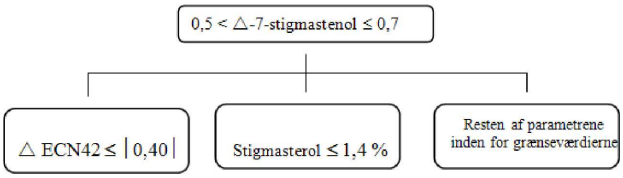
Campesterol-beslutningsskema for jomfruolie og ekstra jomfruolie:



De øvrige parametre skal overholde de grænseværdier, der er fastsat i denne forordning.

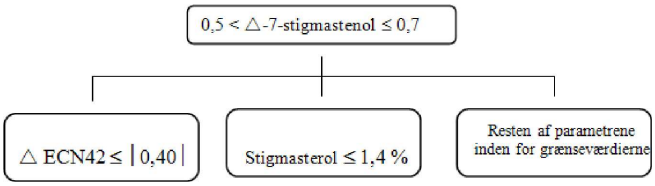
Delta-7-stigmastenol-beslutningsskema for:

— Ekstra jomfruolie og jomfruolie



De øvrige parametre skal overholde de grænseværdier, der er fastsat i denne forordning.

— Olie af olivenpresserester (rå og raffineret)



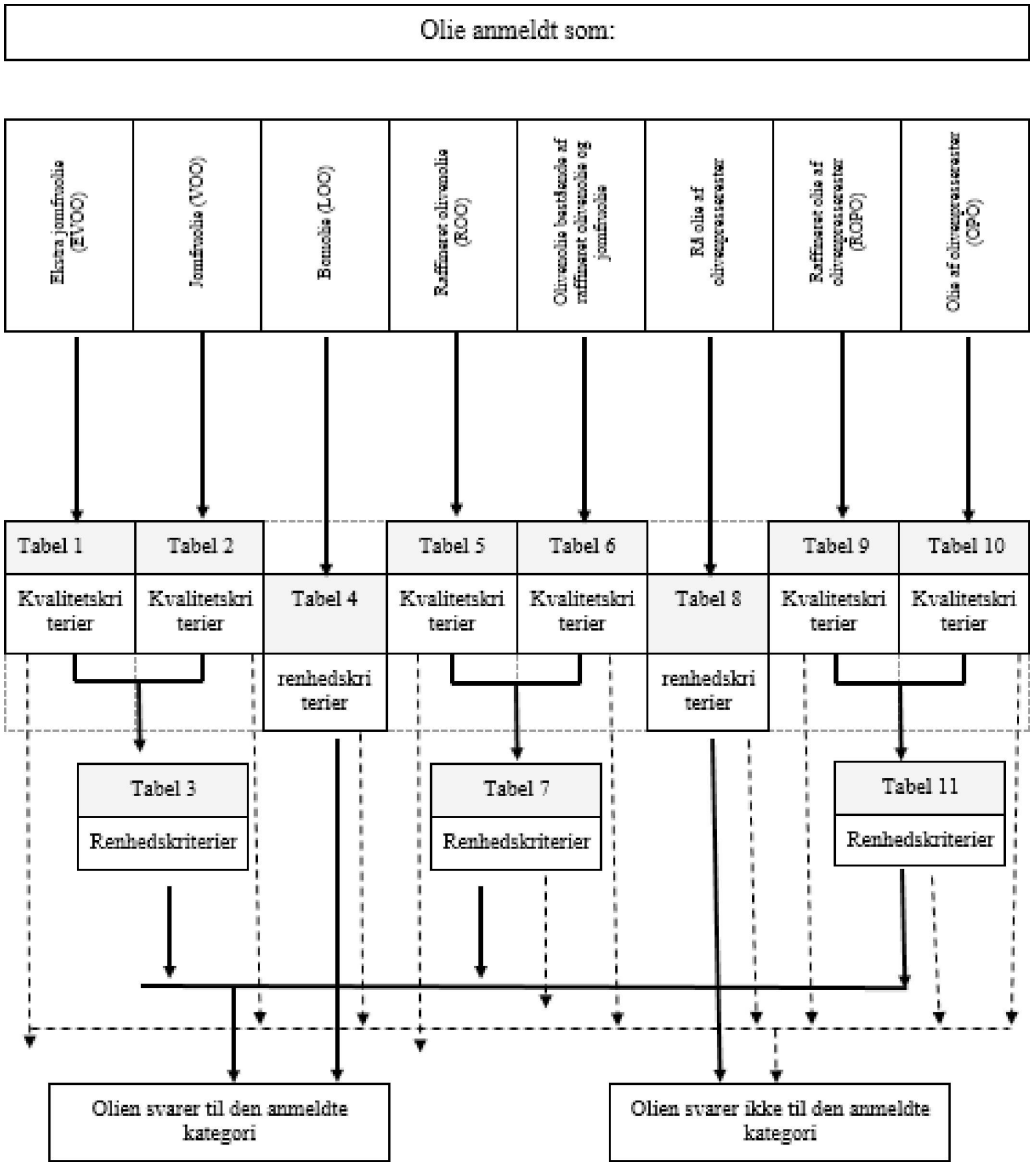
De øvrige parametre skal overholde de grænseværdier, der er fastsat i denne forordning.«

BILAG III

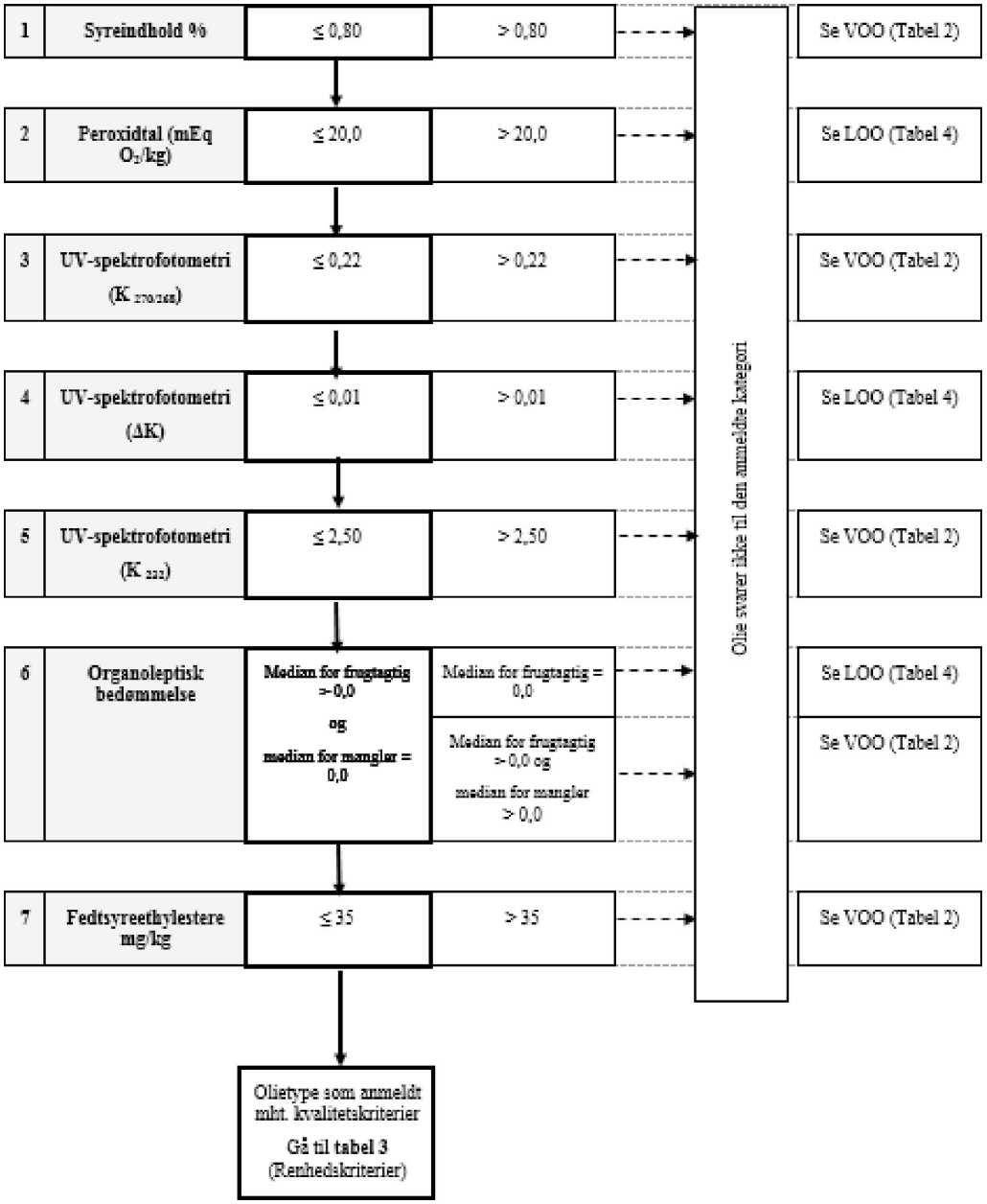
»*ANNEX Ib*

FLOWDIAGRAM TIL KONTROL AF, OM EN OLIVENOLIEPRØVE SVARER TIL DEN ANMELDTE KATEGORI

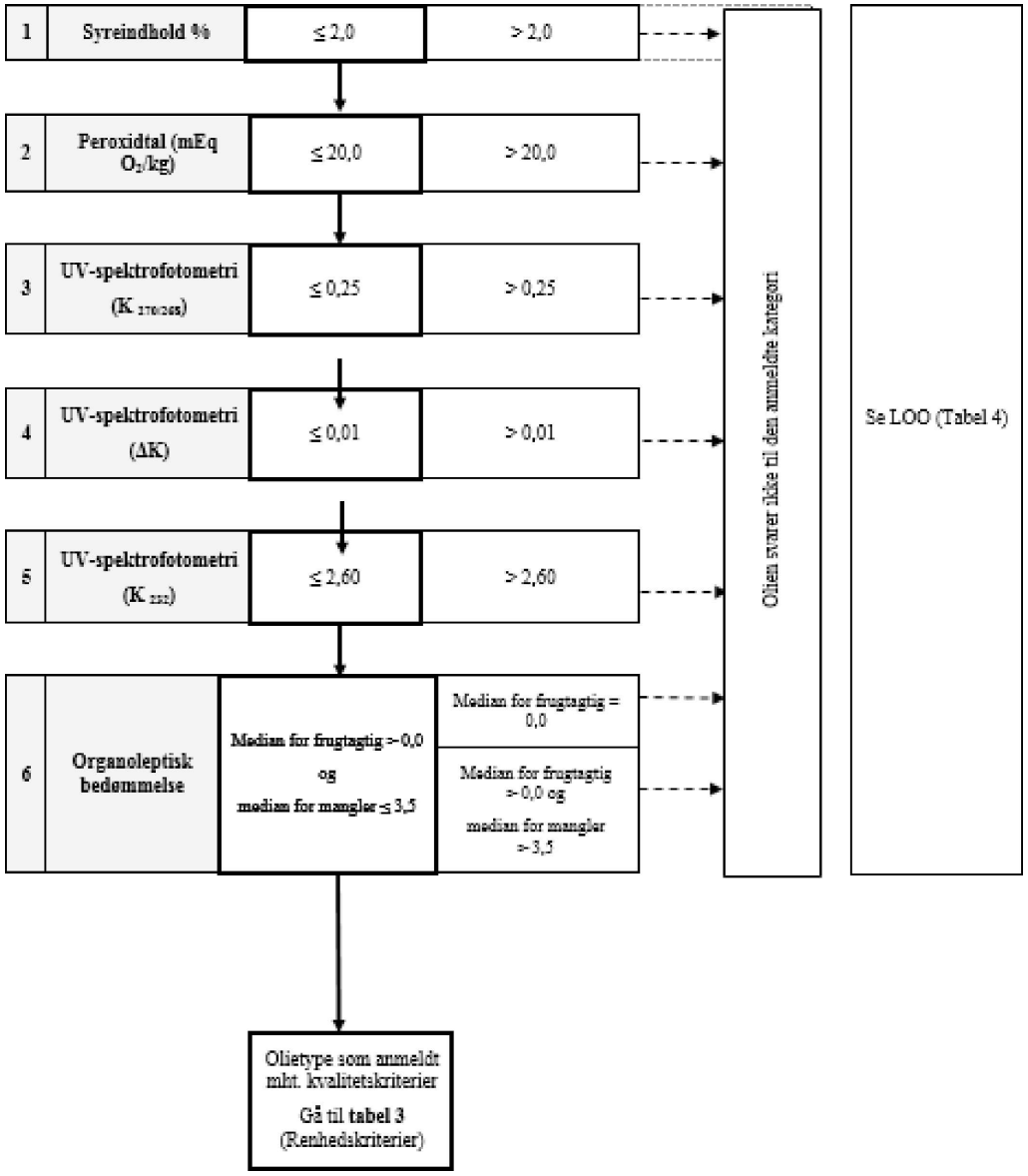
Generel tabel



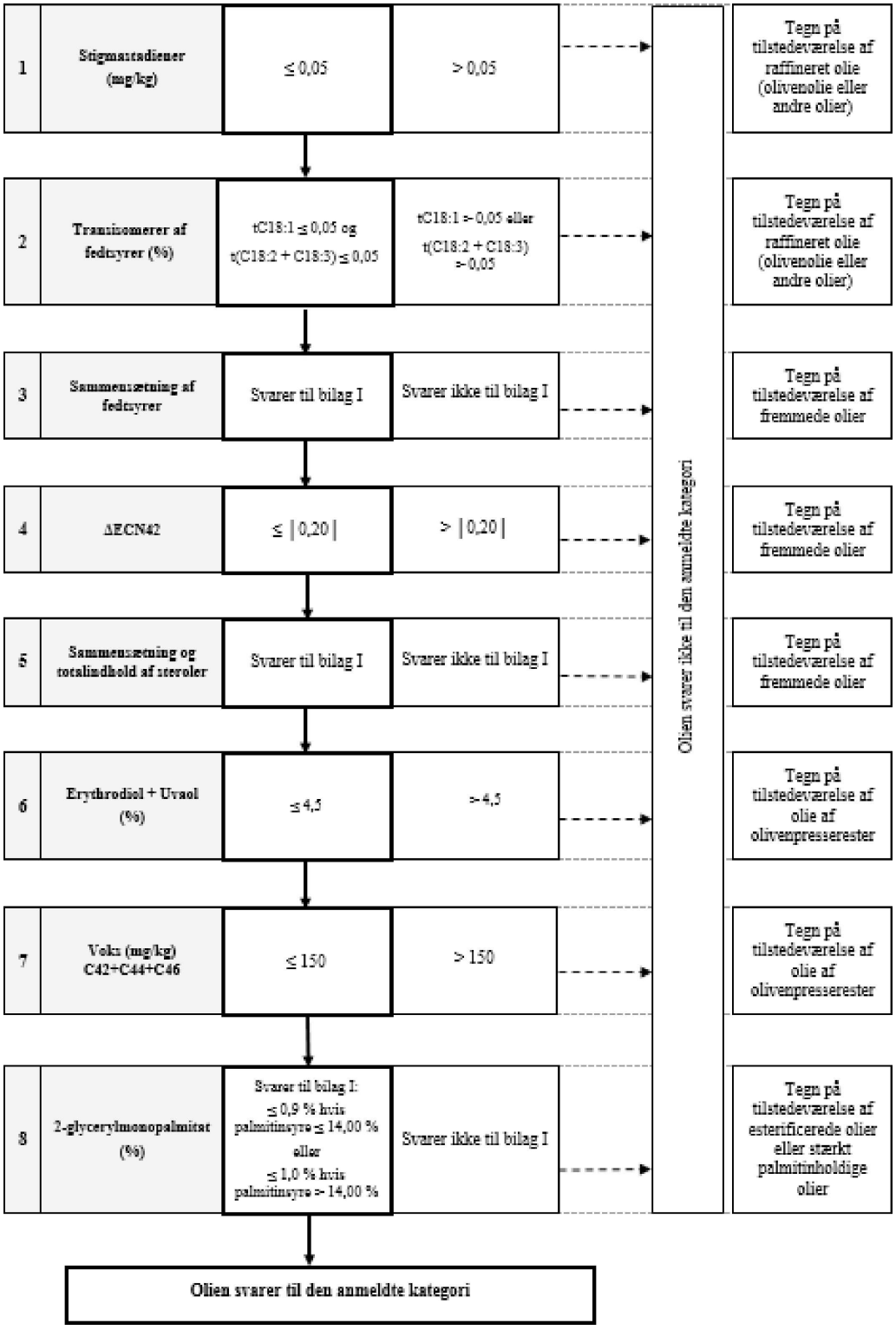
Tabel 1 — Ekstra jomfruolie — Kvalitetskriterier



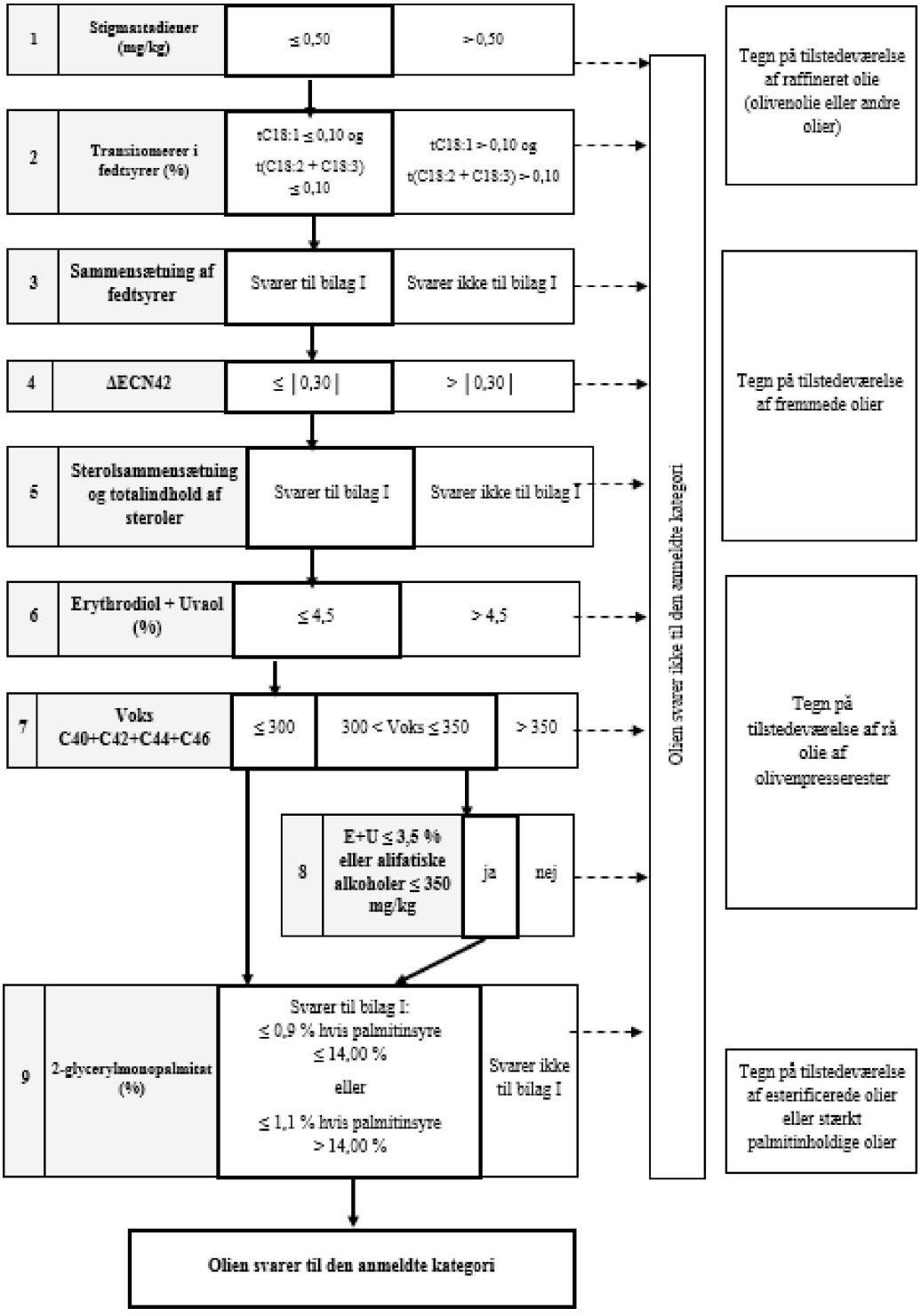
Tabel 2 — Jomfruolie — Kvalitetskriterier



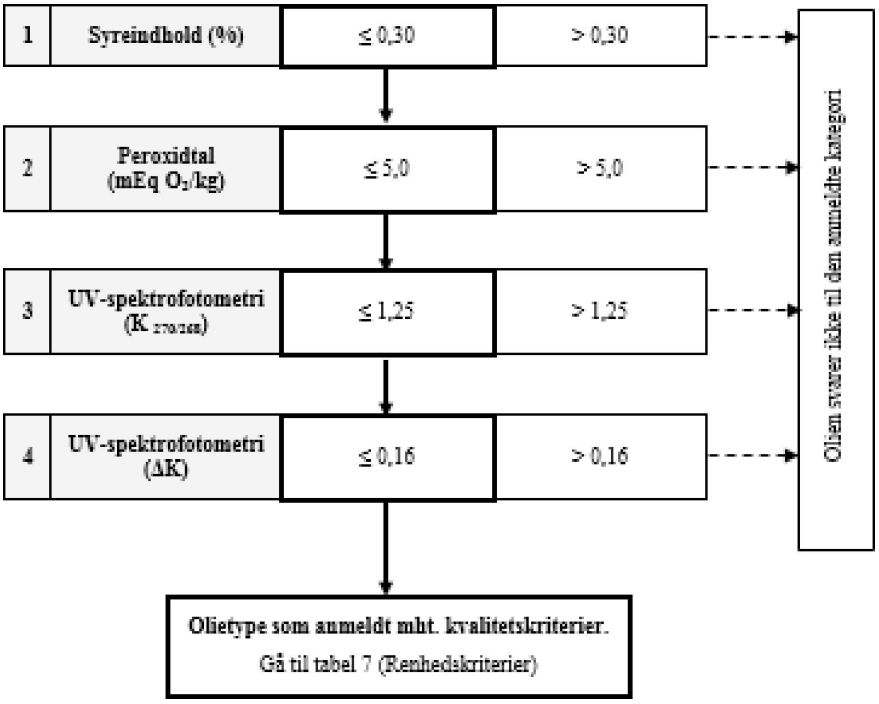
Tabel 3 — Ekstra jomfruolie og jomfruolie — Renhedskriterier



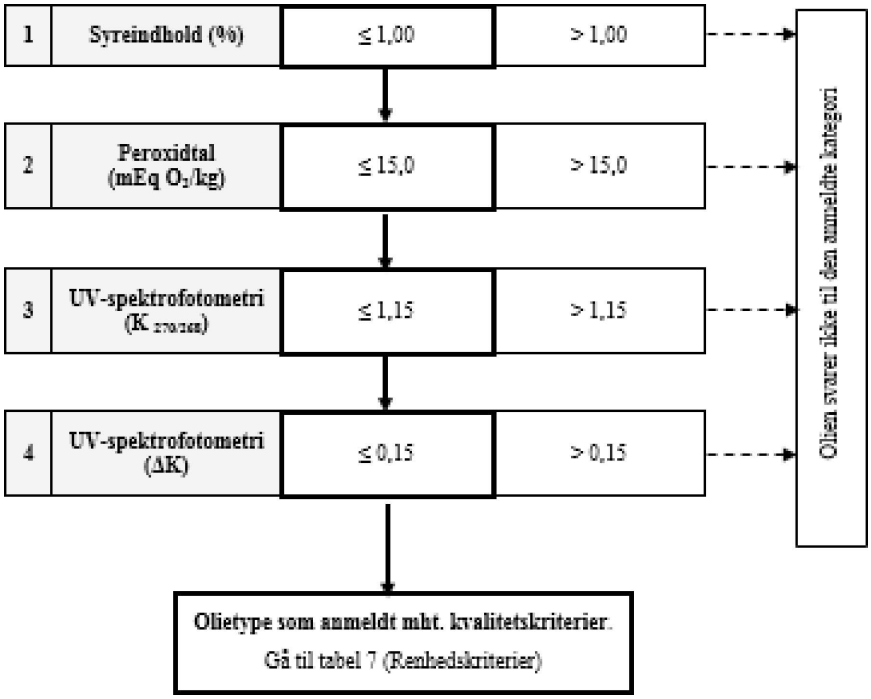
Tabel 4 — Bomolie — Renhedskriterier



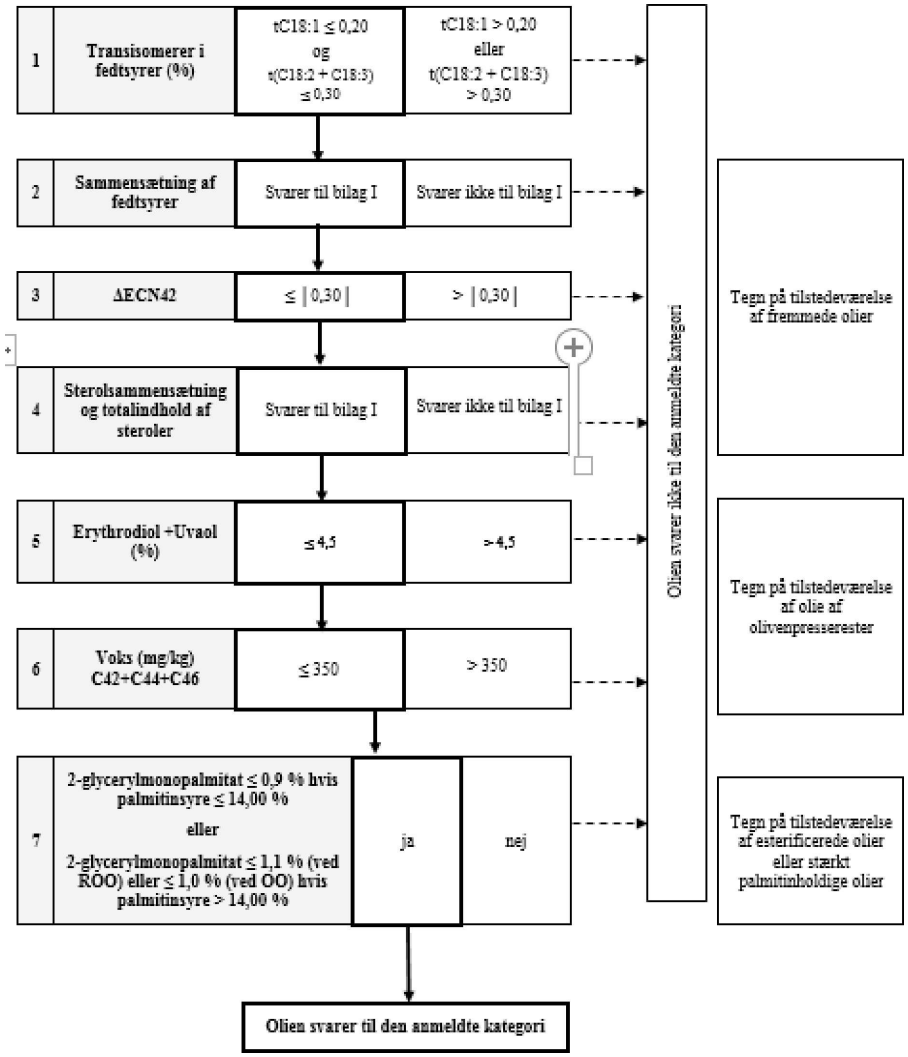
Tabel 5 — Raffineret olivenolie — Kvalitetskriterier



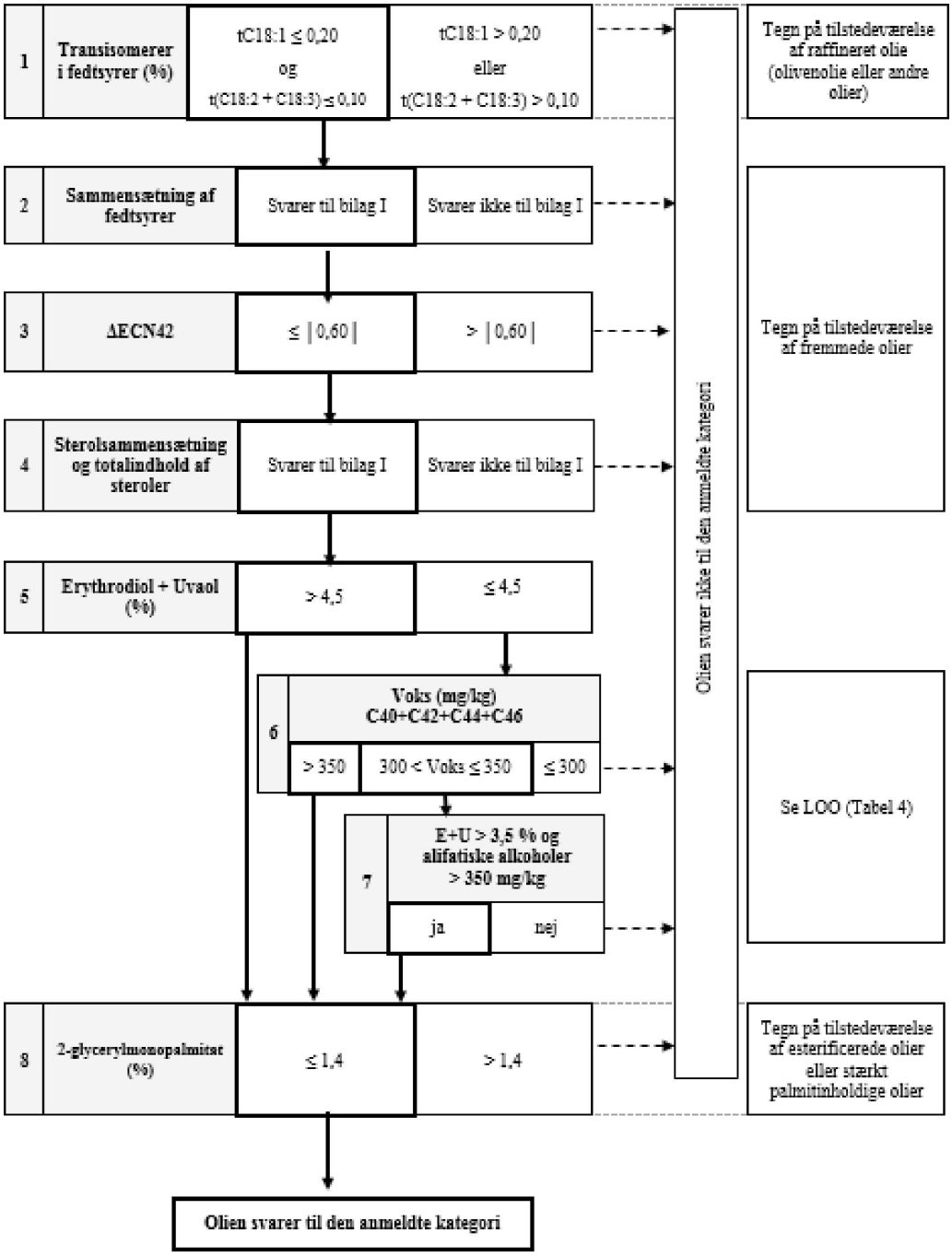
Tabel 6 — Olivenolie — (bestående af raffineret olivenolie og jomfruolie) — Kvalitetskriterier



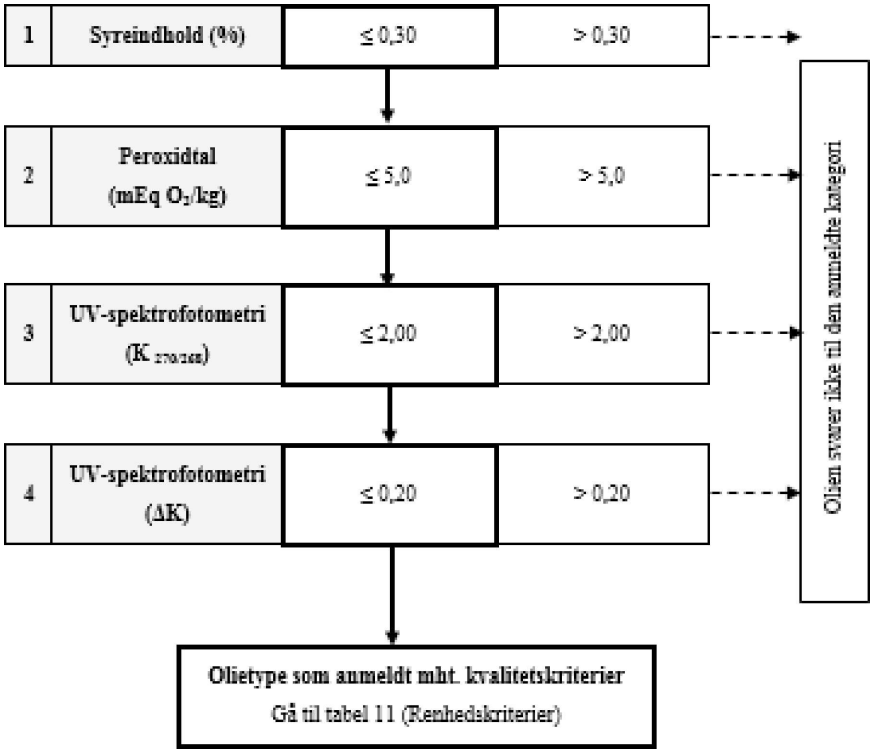
Tabel 7 — Raffineret olivenolie og olivenolie bestående af raffineret olivenolie og jomfruolie — Renhedskriterier



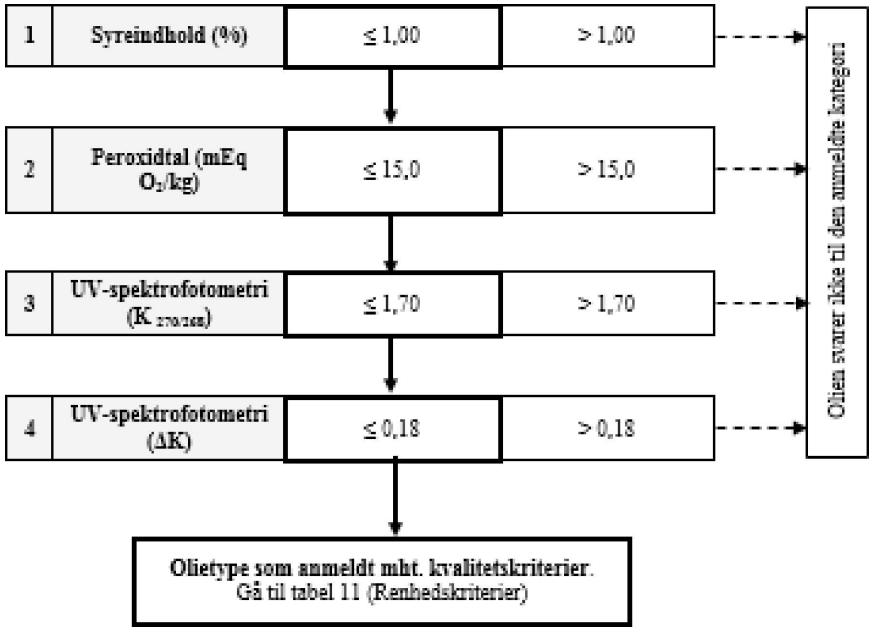
Tabel 8 — Rå olie af olivenpresserester — Renhedskriterier



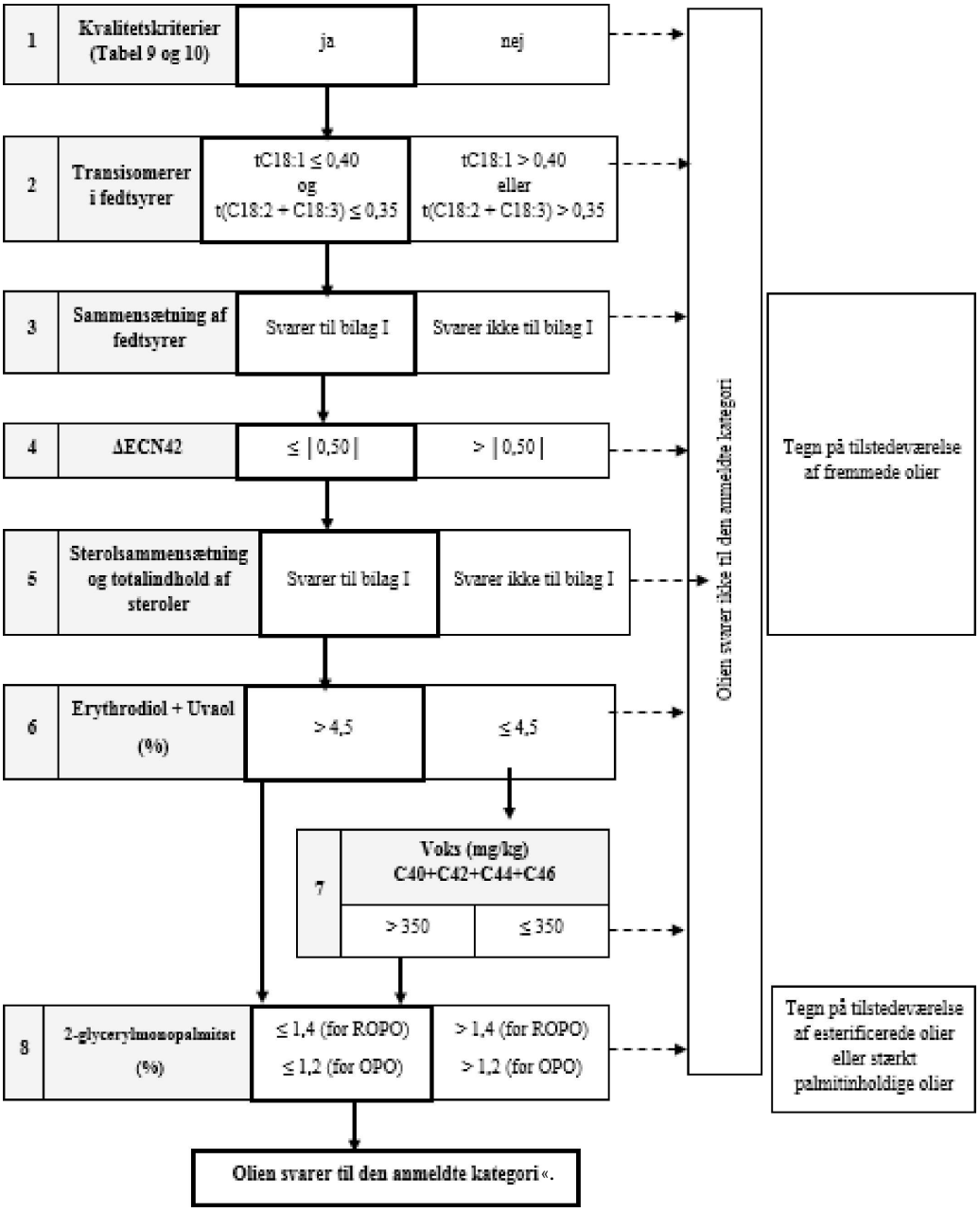
Tabel 9 — Raffineret olie af olivenpresserester — Kvalitetskriterier



Tabel 10 — Olie af olivenpresserester — Kvalitetskriterier



Tabel 11 — Raffineret olie af olivenpresserester og olie af olivenpresserester — Renhedskriterier



BILAG IV

I bilag XII foretages følgende ændringer:

1) Punkt 3.3 affattes således:

»3.3. **Frivillig anvendelse af ord og udtryk på etiketter**

Panellederen kan på anmodning attestere, at de bedømte olier overholder de definitioner og intervaller, der udelukkende svarer til følgende udtryk i forhold til intensiteten og opfattelsen af egenskaberne.

Positive egenskaber (frugtagtig, bitter og skarp): I forhold til intensiteten af opfattelsen benyttes udtrykket:

— *Intens*, hvis medianen for den pågældende egenskab er på over 6,0

— *Middel*, hvis medianen for den pågældende egenskab er på over 3,0 og 6,0 eller derunder

— *Let*, hvis medianen for den pågældende egenskab er på 3,0 eller derunder.

Frugtagtig En række olfaktoriske fornemmelser, der afhænger af olivensorten, og som kendetegner olie, som er udvundet af sunde og friske frugter, der hverken er domineret af grønne eller modne frugter. De opfattes direkte og/eller via den bageste del af næsen.

Umoden frugt En række olfaktoriske fornemmelser, der afhænger af olivensorten og minder om umoden frugt, og som kendetegner olie, som er udvundet af umodne, sunde og friske frugter. De opfattes direkte og/eller via den bageste del af næsen.

Moden frugt En række olfaktoriske fornemmelser, der afhænger af olivensorten og minder om moden frugt, og som kendetegner olie, som er udvundet af sunde, friske frugter. De opfattes direkte og/eller via den bageste del af næsen.

Afbalanceret Olie, der ikke viser tegn på mangel på balance. Ved afbalanceret forstås den lugt-, smags- og berøringsfornemmelse, hvor medianen for egenskaben bitter og medianen for egenskaben skarp ikke er mere end 2,0 point større end medianen for egenskaben frugtagtig.

Mild olie Olie, hvor medianen for egenskaben bitter og medianen for egenskaben skarp er 2,0 eller derunder.

Liste over udtryk, der benyttes afhængigt af intensiteten af opfattelsen:

Udtryk til brug ved udformning af et organoleptisk testbevis	Median for egenskaben:
Frugtagtig	—
Moden frugt	—
Umoden frugt	—
Let frugtagtig	≤ 3,0
Middel frugtagtig	3,0 < Me ≤ 6,0
Intensivt frugtagtig	> 6,0
Let moden frugt	≤ 3,0
Middel moden frugt	3,0 < Me ≤ 6,0
Intensiv moden frugt	> 6,0
Let umoden frugt	≤ 3,0
Middel umoden frugt	3,0 < Me ≤ 6,0
Intensiv umoden frugt	> 6,0

Udtryk til brug ved udformning af et organoleptisk testbevis	Median for egenskaben:
Let bitterhed	≤ 3,0
Middel bitterhed	3,0 < Me ≤ 6,0
Intensiv bitterhed	> 6,0
Let skarphed	≤ 3,0
Middel skarphed	3,0 < Me ≤ 6,0
Intensiv skarphed	> 6,0
Afbalanceret olie	Medianen for egenskaben bitter og medianen for egenskaben skarp er ikke over 2,0 point over medianen for frugtagtighed
Mild olie	Medianen for egenskaben bitter og medianen for egenskaben skarp er 2,0 eller derunder«

2) Punkt 9.4 affattes således:

»9.4. **Klassifikation af olien**

Olien klassificeres på følgende måde i forhold til medianen for mangler og medianen for egenskaben frugtagtig. Ved medianen for manglerne forstås medianen for den mangel, der opfattes med den største intensitet. Medianen for mangler og medianen for egenskaben frugtagtig udtrykkes med én decimal.

Olien klassificeres ved at sammenligne værdien af medianen for mangler og medianen for egenskaben frugtagtig med de referenceintervaller, der er anført nedenfor. Da grænseværdien for disse intervaller er fastlagt under hensyn til metodens fejlmargen, anses de for at være absolutte. Med computerprogrammer er det muligt at vise klassifikationen i en tabel med statistiske data eller som grafik.

a) Ekstra jomfruolie: Medianen for mangler er lig med 0,0, og medianen for egenskaben frugtagtig er større end 0,0.

b) Jomfruolie: Medianen for mangler er større end 0,0, men ikke større end 3,5, og medianen for egenskaben frugtagtig er større end 0,0.

c) Bomolie: Medianen for manglerne er større end 3,5, eller medianen for manglerne er 3,5 eller derunder, og medianen for egenskaben frugtagtig er lig med 0,0.

Note 1: Når medianen for egenskaben bitter og/eller skarp er større end 5,0, skal panellederen angive det på testbeviset.

Hvis der foretages analyser i forbindelse med kontrol af overensstemmelse, gennemføres der et forsøg. Hvis der foretages kontrolanalyser, skal der gennemføres en dobbelt analyse ved forskellige smagninger. Resultaterne af den dobbelte analyse skal være statistisk homogene. (jf. punkt 9.5). Er de ikke det, skal prøven analyseres på ny to gange. Den endelige værdi af medianen for klassifikationsegenskaberne beregnes ud fra gennemsnittet af begge medianer.«

BILAG V

I bilag XVII foretages følgende ændringer:

1) Punkt 5.1 affattes således:

»5.1. Hexan eller blanding af alkaner med kogepunktsinterval på 65-70 °C, destilleret med rektifikationskolonne. Hexan kan erstattes af isooctan (2,2,4-trimethylpentan til kromatografering), såfremt der opnås sammenlignelige nøjagtighedsværdier. Restproduktet efter fordampningen af 100 ml opløsningsmiddel kan kontrolleres. Opløsningsmidler med et højere kogepunkt end n-hexan fordamper langsommere. De foretrækkes imidlertid grund af hexans toksicitet.«

2) I punkt 6.3.3 tilføjes følgende tekst:

»Note 10. Forekommer der stigmastadiener i koncentrationer på over 4 mg/kg, og er en kvantificering nødvendig, skal Det Internationale Olivenråds metoder til bestemmelse af sterener i raffineret olie anvendes.«

BILAG VI

I bilag XVIII foretages følgende ændringer:

1) Punkt 4.2.1 affattes således:

»4.2.1. Petroleumsether (40-60 °C) til kromatografering eller hexan. Hexan kan erstattes af isooctan (2,2,4-trimethylpentan til kromatograferingen), såfremt der opnås sammenlignelige nøjagtighedsværdier. Opløsningsmidler med et højere kogepunkt end n-hexan fordamper langsommere. De foretrækkes imidlertid grund af hexans toksicitet.«

2) Følgende indsættes som punkt 4.2.12:

»4.2.12. Heptan, til kromatografi. Heptan kan erstattes af isooctan (2,2,4-trimethylpentan til kromatograferingen).«

BILAG VII

»*BILAG XIX*

BESTEMMELSE AF SAMMENSÆTNINGEN OG INDHOLDET AF STEROLER OG ALKOHOLFORBINDELSER VED GASKROMATOGRAFI PÅ KAPILLARKOLONNE

1. GENSTAND

Metoden beskriver fremgangsmåden til bestemmelse af indholdet af hver alkoholforbindelse og det totale indhold af alkoholforbindelser i såvel olivenolier og olie af olivenpresserester som i blandinger af disse to olier.

Alkoholforbindelserne i olivenolier og olie af olivenpresserester omfatter alifatiske alkoholer, steroler og triterpendialkoholer.

2. PRINCIP

Olierne, med α-cholestanol og 1-eicosanol tilsat som interne standarder, forsæbes med kaliumhydroxid i ethanolopløsning, og de bestanddele, der ikke kan forsæbes, ekstraheres derefter med ethylether.

De forskellige fraktioner af alkoholforbindelserne adskilles fra de uforsæbelige stoffer ved enten tyndtlagskromatografi på en basisk kiselgelplade (referencemetode) eller gennem HPLC ved hjælp af silicagelkolonne. Den isolerede fraktion, der er indvundet fra kiselgelen, omdannes til trimethylsilylethere og analyseres derefter ved hjælp af gaskromatografi på kapillarkolonne.

DEL 1

FREMSTILLING AF UFORSÆBELIGT STOF:

1. GENSTAND

I denne del beskrives fremstillingen og ekstraktionen af de uforsæbelige stoffer. Det omfatter fremstillingen og ekstraktionen af de uforsæbelige stoffer fra olivenolie og olie af olivenpresserester.

2. PRINCIP

En prøvemængde forsæbes ved, at en opløsning af kaliumhydroxid i ethanol koges med tilbagesvaling. De uforsæbelige stoffer ekstraheres med diethylether.

3. APPARATUR

Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder især følgende:

3.1. Rundkolbe med tilbageløbssvaler med glasslib, 250 ml.

3.2. Skilletragt, 500 ml.

3.3. Kolber, 250 ml.

3.4. Mikrosprøjter, 100 µl og 500 µl.

3.5. Cylindrisk filtertragt med G3-glasfritte (porøsitet 15-40 µm), med en diameter på ca. 2 cm og en højde på ca. 5 cm, egnet til vakuumfiltrering og med et udvendigt konisk glasslib.

3.6. Konisk kolbe med et indvendigt glasslib, 50 ml, som filtertragten kan monteres på (3.5).

3.7. Reagensglas med konisk bund og tætsluttende prop, 10 ml.

3.8. Calciumchlorid-ekssikkator.

4. REAGENSER

4.1. Kaliumhydroxid, minimum titer 85 %.

4.2. Kaliumhydroxid i ethanolopløsning, ca. 2 M.

130 g kaliumhydroxid (4.1) opløses i 200 ml destilleret vand under afkøling, og der tilsættes ethanol til et samlet volumen på 1 liter (4.7). Opløsningen opbevares i veltilproppede, mørke glasflasker i højst to dage.

4.3. Ethylether (analysekvalitet).

4.4. Vandfrit natriumsulfat (analysekvalitet).

4.5. Acetone (kromatografikvalitet).

4.6. Ethylether (kromatografikvalitet).

4.7. Ethanol (analysekvalitet).

4.8. Ethylacetat (analysekvalitet).

4.9. Intern standard, αα-cholestanol, renhed over 99 % (renhed skal kontrolleres ved hjælp af GC-analyse).

4.10. α-cholestanol-opløsning, intern standard, 0,2-opløsning (m/V) i ethylacetat (4.8).

4.11. Phenolphthaleinopløsning, 10 g/l i ethanol (4.7).

4.12. 1-eicosanol, 0,1 % (m/v)-opløsning i ethylacetat (intern standard)

5. FREMGANGSMÅDE

Med en 500 µl-mikrosprøjte (3.4) overføres så meget α-cholestanol-opløsning (intern standard) (4.10) og så meget 1-eicosanol (4.12) til 250 ml-kolben (3.1), at mængden af cholestanol og eicosanol er ca. 10 % af prøvens sterol- og alkoholindhold. Eksempelvis skal der ved en olivenolieprøve på 5 g tilsættes 500 µl α-cholestanol-opløsning (4.10) og 250 µl 1-eicosanol-opløsning (4.12). Ved olie fra olivenpresserester tilsættes der 1 500 µl af såvel α-cholestanol-opløsning (4.10) som 1-eicosanol-opløsning (4.12). Prøven inddampes til tørhed i en svag nitrogenstrøm i varmt vandbad. Efter nedkøling af kolben afvejes 5,00 ± 0,01 g af den tørrede filtrede prøve til den samme kolbe.

Note 1: Ved animalske eller vegetabilske olier og fedtstoffer, der indeholder betydelige mængder cholesterol, kan der optræde en top med samme retentionstid som cholestanol. I dette tilfælde analyseres sterolfraktionen en gang med og en gang uden intern standard.

Tilsæt 50 ml 0,2 M opløsning af kaliumhydroxid i ethanol (4.2) og pimpsten, påsæt tilbageløbssvaleren, og opvarm til svag kogning, indtil forsæbningen sker (opløsningen bliver klar). Opvarmningen fortsættes i endnu 20 minutter. Derefter tilsættes 50 ml destilleret vand fra den øverste del af svaleren, svaleren tages af, og kolben afkøles til ca. 30 °C.

Overfør kolbens indhold kvantitativt til en 500 ml-skilletragt (3.2), idet der skylles flere gange med destilleret vand (50 ml). Tilsæt ca. 80 ml ethylether (4.6), og ryst kraftigt i ca. 60 sekunder, idet presset regelmæssigt frigives ved at vende skilletragten på hovedet og åbne stophanen. Lad skilletragten henstå, indtil fuldstændig separation af de to faser er opnået (note 2). Aftap derefter så meget af sæbeopløsningen som muligt i en anden skilletragt. Foretag endnu to ekstraktioner på den vandige/alkoholholdige fase på samme måde, idet der bruges 60 til 70 ml ethylether (4.6).

Note 2: Eventuel emulsion kan ødelægges ved tilsætning af små mængder ethanol (4.7).

De tre etherekstrakter samles i en enkelt skilletragt, der indeholder 50 ml vand. Vask med vand (50 ml), indtil vaskevandet ikke længere bliver lyserødt, når der tilsættes en dråbe af phenolphthaleinopløsningen (4.11). Når vaskevandet er hældt af, filtreres på vandfrit natriumsulfat (4.4) ned i en på forhånd vejet 250 ml kolbe, idet tragt og filter vaskes med små mængder ethylether (4.6).

Opløsningen inddampes ved destillation i en rotationsfordamper ved 30 °C under vakuum. Der tilsættes 5 ml acetone (4.5), og det flygtige opløsningsmiddel fjernes fuldstændigt i en svag nitrogenstrøm. Tør reststoffet i ovnen ved 103 ± 2 °C i 15 minutter. Afkøl i en ekssikkator, og afvej til nærmeste 0,1 mg.

DEL 2

SEPARATION AF FRAKTIONEN AF ALKOHOLFORBINDELSEN

1. GENSTAND

De uforsæbelige stoffer, der er tilberedt under del 1, fraktioneres i de forskellige alkoholforbindelser, dvs. alifatiske alkoholer, steroler og triterpendialkoholer (erythrodiol og uvaol).

2. PRINCIP

De uforsæbelige stoffer kan fraktioneres ved hjælp af basiske plader til tyndtlagskromatografi (referencemetode) og gøres synlige, og de tilhørende bånd kan skrabes og ekstraheres. Som alternativ separationsmetode kan anvendes en HPLC med silicagelkolonne og en UV-detektor og kan de forskellige fraktioner opsamles. De alifatiske alkoholer og triterpenalkoholerne samt sterol- og triterpendialkoholerne isoleres sammen.

3. APPARATUR

Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder især følgende:

3.1. Komplet apparatur til analyse ved tyndtlagskromatografi med glasplader (20 × 20 cm).

3.2. Ultraviolet lampe med en bølgelængde på 366 eller 254 nm.

3.3. Mikrosprøjter, 100 µl og 500 µl.

3.4. Cylindrisk filtertragt med G3-glasfritte (porøsitet 15-40 µm), med en diameter på ca. 2 cm og en højde på ca. 5 cm, egnet til vakuumfiltrering og med et udvendigt konisk glasslib.

3.5. Konisk kolbe med et indvendigt glasslib, 50 ml, som filtertragten kan monteres på (3.4).

3.6. Reagensglas med konisk bund og tætsluttende prop, 10 ml.

3.7. Calciumchlorid-ekssikkator.

3.8. HPLC-system bestående af:

3.8.1. Binær pumpe.

3.8.2. Manuel eller automatisk injektor med en injektionssløjfe på 200 µl.

3.8.3. Integreret aflufter.

3.8.4. UV-VIS- eller IR-detektor.

3.9. HPLC-kolonne (25 cm × 4 mm i indre diameter) med kiselgel 60 (kornstørrelse 5 µm).

3.10. Sprøjtefilter, 0,45 µm.

3.11. Konisk kolbe 25 ml.

4. REAGENSER

4.1. Kaliumhydroxid, minimum titer 85 %.

4.2. Kaliumhydroxid i ethanolopløsning, ca. 2 M.

130 g kaliumhydroxid (4.1) opløses i 200 ml destilleret vand under afkøling, og der tilsættes ethanol til et samlet volumen på 1 liter (4.9). Opløsningen opbevares i veltilproppede, mørke glasflasker i højst to dage.

4.3. Ethylether (analysekvalitet).

4.4. Kaliumhydroxid i ethanolopløsning, ca. 0,2 M.

13 g kaliumhydroxid (4.1) opløses i 20 ml destilleret vand, og der tilsættes ethanol til et samlet volumen på 1 liter (4.7).

4.5. Glasplader (20 × 20 cm) belagt med kiselgel uden fluorescensindikator, tykkelse 0,25 mm (kan fås brugsfærdige i handelen)

4.6. Acetone (kromatografikvalitet).

4.7. n-Hexan (kromatografikvalitet).

4.8. Ethylether (kromatografikvalitet).

4.9. Ethanol (analysekvalitet).

4.10. Ethylacetat (analysekvalitet).

4.11. Referenceopløsning til tyndtlagskromatografi: 5 %-opløsning af cholesterol, phytosteroler, alkoholer og Erythrodiol i ethylacetat (4.10).

4.12. 0,2 %-opløsning af 2,7-dichlorfluorescein i ethanolopløsning. Gøres svagt basisk ved tilsætning af få dråber alkoholisk 2 M-kaliumhydroxidopløsning (4.2).

4.13. n-Hexan (4.7)/ethylether (4.8) i forholdet 65:35 (V/V).

4.14. Mobil fase til HPLC, n-hexan (4.7)/ethylether (4.8) (1:1) (V/V).

5. REFERENCEMETODE: SEPARATION AF ALKOHOLFORBINDELSER VED HJÆLP AF BASISK TYNDTLAGSCHROMATOGRAFI-PLADE (TLC)

Fremstilling af basiske plader til tyndtlagskromatografi. Kiselgelpladerne (4.5) nedsænkes eller neddyppes ca. 4 cm i 0,2 M opløsningen af kaliumhydroxid i ethanol (4.4) i 10 sekunder, hvorefter de tørres i et udsugningsskab i to timer og derefter anbringes i ovnen ved 100 °C i en time.

Pladerne tages ud af ovnen og opbevares i en calciumchlorid-ekssikkator (3.7), indtil de skal bruges (plader, der er behandlet på denne måde, skal anvendes inden 15 dage).

Hæld en hexan/ethyletherblanding (4.13) (note 3) i kromatografikammeret til en dybde på ca. 1 cm. Sæt låg på kammeret, og lad det henstå således et køligt sted i mindst en halv time, så der opnås ligevægt mellem væske og damp. Strimler af filtrerpapir, der dypper ned i eluenten, kan anbringes på kammerets indre overflader. Dette reducerer elueringstiden med ca. 1/3 og giver en mere ensartet og regelmæssig eluering af komponenterne.

Note 3: Kromatografiblandingen udskiftes for hver test for at opnå fuldstændig reproducerbare elueringsbetingelser. Alternativt kan en opløsning på 50:50 (V/V) n-hexan/ethylether anvendes.

Der tilberedes en ca. 5 %-opløsning af de under del 1 tilberedte uforsæbelige stoffer i ethylacetat (4.10), og med 100 µl-mikrosprøjten (3.3) afsættes 0,3 ml af opløsningen på en smal og ensartet streg nederst (ca. 2 cm) på kromatografipladen (4.5). I forlængelse af startlinjen afsættes 2-3 µl af referenceopløsningen (4.11), så sterol-, triterpendialkohol- og alkoholbåndene kan identificeres efter eluering.

Pladen anbringes i kromatografikammeret (3.1). Omgivelsestemperaturen bør holdes mellem 15 og 20 °C (note 4). Kammeret lukkes straks med låget, og der elueres, indtil opløsningsmiddelfronten er ca. 1 cm fra pladens øverste kant. Derefter tages pladen ud af kromatografikammeret, og opløsningsmidlet lades fordampe i en strøm af varm luft eller ved at lade pladen stå en kort tid i udsugningsskab.

Note 4: En højere temperatur kan forringe separationen.

Pladen sprøjtes let og ensartet med 2,7-dichlorfluorosceinopløsningen (4.12), hvorefter den henstår til tørring. Når pladen observeres under en lampe med ultraviolet lys (3.2), kan sterol-, triterpendialkohol- og alkoholbåndet identificeres ved, at det er på linje med de pletter, der er afsat ved hjælp af referenceopløsningen (4.11). Båndets grænser langs fluorescenckanterne markeres med en sort blyant (se tyndtlagskromatografipladen i figur 1).

Med en metalspatel skrabes kiselgelen i det markerede område af. Det fjernede materiale pulveriseres fint og placeres i filtertragten (3.4). Tilsæt 10 ml varm ethylacetat (4.10), bland det omhyggeligt med metalspatelen, og filtrer (i givet fald under vakuum), hvorefter filtratet opsamles i den koniske kolbe (3.5), der er sat på filtertragten.

Reststoffet i kolben vaskes tre gange med ethylether (4.3) (ca. 10 ml hver gang), idet filtratet opsamles i den samme kolbe, der er påsat filtertragten. Filtratet inddampes til et rumfang af 4 til 5 ml. Den tilbageværende opløsning overføres til det på forhånd vejede 10 ml-reagensglas (3.6). Inddamp til tørhed ved let opvarmning i en svag nitrogenstrøm, fyld op med et par dråber acetone (4.6), og inddamp igen til tørhed. Reststoffet i reagensglasset består af fraktionen af steroler, triterpendialkoholer eller fraktionen af alkoholer eller triterpenalkoholer.

6. SEPARATION AF ALKOHOLFRAKTIONEN VED HJÆLP AF HPLC

De uforsæbelige stoffer fra del 1 opløses i 3 ml af den mobile fase (4.14), og opløsningen filtreres gennem et injektionsfilter (3.10) og stilles til side.

200 µl af den filtrede opløsning af de uforsæbelige stoffer indføres i HPLC-systemet (3.8).

HPLC-separationen gennemføres ved 0,8 ml/min, der ses bort fra de første 5 min., og i 25 ml koniske kolber (3.11) opfanges der i tidsrummet mellem 5 og 10 min. alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer, og i tidsrummet mellem 11 og 25 min. opfanges steroler, erythrodiol og uvaol (note 5).

Separationen kan overvåges ved hjælp af en UV-detektor ved en bølgelængde på 210 nm eller ved hjælp af en RI-detektor (refractive index) (jf. figur 6).

Fraktionerne afdampes indtil tørhed, hvorefter de tilberedes med henblik på kromatografisk analyse.

Note 5: HPLC-pumpens tryk kontrolleres omhyggeligt, da ethylether kan få trykket til at stige, og gennemstrømningen skal tilpasses, så trykket holdes under kontrol.

DEL 3

GASKROMATOGRAFISK ANALYSE AF FRAKTIONEN AF ALKOHOLFORBINDELSERNE

1. GENSTAND

Denne del indeholder generelle retningslinjer for anvendelse af gaskromatografi på kapillarkolonne til bestemmelse af den kvalitative og kvantitative sammensætning af de alkoholforbindelser, der isoleres i overensstemmelse med den i del 2 beskrevne metode.

2. PRINCIP

De fraktioner, der opsamles fra de uforsæbelige stoffer ved hjælp af TLC eller HPLC, derivatiseres i trimethylsilylethere og analyseres ved hjælp af gaskromatografi på kapillarkolonne med splitinjektion og flammeionisationsdetektor.

3. APPARATUR

Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder især følgende:

3.1. Reagensglas med konisk bund og tætsluttende prop, 10 ml.

3.2. Gaskromatograf, som kan bruges med kapillarkolonne (med splitningssystem), og som består af:

3.2.1. et termostatkammer til kolonner, som kan opretholde den ønskede temperatur med en nøjagtighed på ± 1 °C

3.2.2. en injektionsenhed med temperaturindstilling, et fordampningselement af silanglas og splitningssystem

3.2.3. en flammeioniseringsdetektor (FID)

3.2.4. et dataopsamlingssystem, som kan bruges med FID-detektoren (3.10.3), og som kan integreres manuelt.

3.3. En kapillarkolonne af kvartsglas med en længde på 20 til 30 m, en indre diameter på 0,25 til 0,32 mm, helt overtrukket med en blanding af 5 % diphenyl og 95 % dimethylpolysiloxan (SE 52- eller SE 54-væske eller tilsvarende) i en ensartet tykkelse på mellem 0,10 og 0,30 µm.

3.4. 10 µl-mikrosprøjte til gaskromatografi med cementeret nål, der kan bruges til splitinjektion.

4. REAGENSER

4.1. Vandfri pyridin (kromatografikvalitet).

4.2. Hexamethyl-disilazan (analysekvalitet).

4.3. Trimethylchlorsilan (analysekvalitet).

4.4. Prøveopløsninger af sterol-trimethylsilylethere. Tilberedes på anvendelsestidspunktet fra steroler og erytrodiol udvundet af sterol- og erytrodiolholdige olier.

4.5. Standardopløsninger af trimethylsilylethere af alifatiske alkoholer fra C20 til C28. De tilberedes på anvendelsestidspunktet ud fra rene alkoholer.

4.6. Bæregas: hydrogen eller helium, gaskromatografikvalitet.

4.7. Hjælpegasser: hydrogen, helium, nitrogen og luft, gaskromatografikvalitet.

4.8. Silyleringsreagens bestående af en blanding i forholdet 9:3:1 (V/V/V) af pyridin/hexamethyl-disilazan/trimethylchlorsilan.

4.9. n-Hexan (kromatografikvalitet).

5. FREMSTILLING AF TRIMETHYLSILYLETHERE (TMSE)

Tilsæt silyleringsreagenset (4.8) (note 6), i forholdet 50 µl for hvert milligram alkoholforbindelse, til reagensglasset (3.1) med fraktionen af alkoholforbindelsen, idet enhver optagelse af fugt undgås (note 7).

Note 6: Opløsninger klar til brug fås i handelen. Derudover findes der også andre silyleringsreagenser, som f. eks. bis-trimethylsilyltrifluoracetamid + 1 % trimethylchlorsilan, som skal fortyndes med samme volumen vandfri pyridin. Pyridin kan erstattes med samme mængde acetonitril.

Note 7: Den lette opalisering, som kan fremkomme, er normal og giver ikke anledning til interferens. Hvis der dannes hvide fnug eller fremkommer en lyserød farve, er det tegn på tilstedeværelsen af fugt eller svækkelse af reagenset. I disse tilfælde skal testen gentages (kun ved anvendelse af hexamethyldisilazan/trimethylchlorsilan).

Reagensglasset tilproppes (3.1) og rystes omhyggeligt (uden at vende bunden i vejret på det), indtil forbindelserne er fuldstændig opløst. Lad henstå i mindst 15 minutter ved omgivelsestemperatur, og centrifuger derefter i et par minutter. Den klare opløsning er parat til gaskromatografisk analyse.

6. GASKROMATOGRAFISK ANALYSE.

6.1. Forberedelse, konditionering af kapillarkolonnen.

Kolonnen (3.3) monteres i gaskromatografen, idet indløbsenden forbindes med splitinjektoren, og udløbsenden forbindes med detektoren.

Der foretages en generel kontrol af gaskromatografen (lækager fra gaskredsløbene, detektorens effektivitet, splittersystemets og registreringssystemets effektivitet osv.)

Anvendes kolonnen for første gang, anbefales det, at den underkastes en konditionering: Man lader en svag gasstrøm passere gennem kolonnen, hvorefter der tændes for gaskromatografienheden. Derefter begynder man gradvis at varme op til en temperatur på mindst 20 °C over driftstemperaturen (note 8). Denne temperatur opretholdes i mindst to timer. Derefter sættes hele enheden i driftstilstand (justering af gasstrømme og splittersystem, antændelse af flammen, forbindelse til computeren, justering af kolonnekammerets, detektorens og injektorens temperatur osv.), og dernæst registreres signalet med en følsomhed, der er mindst to gange større end den, man agter at anvende til analysen. Basislinjens forløb skal være lige uden toppe af nogen art, og den må ikke glide. Negativ glidning af en lige linje tyder på lækage fra kolonnens forbindelser. Positiv glidning tyder på utilstrækkelig konditionering af kolonnen.

Note 8: Konditioneringstemperaturen skal altid være mindst 20 °C lavere end den maksimumstemperatur, der er angivet for den anvendte stationære fase.

6.2. Driftsforhold

Temperaturprogrammet og bæregasstrømmen optimeres, således at der opnås kromatogrammer som i figur 3-6.

Følgende parametre blev testet og fundet nyttige:

6.2.1. Alifatiske alkoholer

Ovnprogram	180 °C (8 min.) → 260 °C (ved 5 °C/min) → 260 °C (15 min.)
Injektortemperatur	280 °C
Detektortemperatur	290 °C
Bæregassens lineære hastighed	Helium (20-30 cm/s); Hydrogen (30-50 cm/s)
Splitforhold	1:50 til 1:100
Injiceret volumen	0,5-1 µl TMSE-opløsning

6.2.2. Sterol og triterpendialkoholer

Ovnprogram	260 ± 5 °C isothermisk
Injektortemperatur	280-300 °C
Detektortemperatur	280-300 °C
Bæregassens lineære hastighed	Helium (20-30 cm/s); Hydrogen (30-50 cm/s)
Splitforhold	1:50 til 1:100
Injiceret volumen	0,5-1 µl TMSE-opløsning

Disse betingelser kan ændres afhængigt af kolonnens og gaskromatografens egenskaber, så der opnås kromatogrammer, der opfylder følgende krav:

— Retentionstiden for C26-alkohol skal være 18 ± 5 minutter.

— Toppen for C22-alkohol skal være 80 ± 20 % af fuld skala for olivenolie og 40 ± 20 % af fuld skala for olie af olivenpresserester.

— Retentionstiden for β-sitosteroltoppen bør være 20 ± 5 minutter.

— Campesteroltoppen bør være: for olivenolie (gennemsnitsindhold 3 %) 20 ± 5 % af fuld skala.

— Alle tilstedeværende steroler skal separeres. Toppene skal ikke alene være separeret, men også være fuldstændig opløst, dvs. hver tops spor skal gå tilbage til basislinjen, før sporet går op til den næste top. Ufuldstændig opløsning kan dog tolereres, såfremt toppen ved RRT (relativ retentionstid) 1,02 (sitostanol) kan bestemmes kvantitativt ved brug af den vinkelrette linje.

6.3. Analytisk fremgangsmåde

Med 10 µl-mikrosprøjten (3.4) optages 1 µl hexan, derefter trækkes først 0,5 µl luft og derefter 0,5-1 µl af prøveopløsningen op. Stemplet trækkes længere ud, så kanylen tømmes. Kanylen indføres i injektorens membran, efter 1-2 sekunder injiceres hurtigt, hvorefter kanylen fjernes langsomt efter ca. 5 sekunder. Der kan også anvendes en automatisk injektor.

Registreringen fortsættes, indtil TMSE af de pågældende alkoholforbindelser er fuldstændig elueret. Basislinjen skal fortsat opfylde kravene for driftsbetingelserne (6.2.1 eller 6.2.2).

6.4. Identifikation af toppe

De enkelte toppe identificeres ud fra retentionstiderne og ved sammenligning med blandingen af de alifatiske alkoholer og triterpenalkoholerne eller med sterol- og triterpendialkohol-TMSE, der er analyseret under de samme betingelser. Der vises et kromatogram af fraktionen af alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer i figur 3, og de tilsvarende kromatogrammer for steroler og triterpendialkoholer er angivet i figur 2.

De alifatiske alkoholer elueres i følgende rækkefølge: C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol og C28-ol.

Sterolerne og triterpendialkoholerne elueres i følgende rækkefølge: cholesterol, brassicasterol, ergosterol, 24-methylen-cholesterol, campesterol, campestanol, stigmasterol, Δ7-campesterol, Δ5,23-stigmastadienol, clerosterol, β-sistosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7-stigmastenol, Δ7-avenasterol, erythrodiol og uvaol.

6.5. Kvantitativ vurdering

Top-arealerne for 1-eicosanol og de alifatiske alkoholer C22, C24, C26 og C28 beregnes ved hjælp af dataopsamlingssystemet. Responsfaktoren for 1-eicosanol antages at være lig med 1.

Arealerne for α-cholestanol- samt sterol- og triterpendialkoholtoppene beregnes ved hjælp af computeren. Der ses bort fra toppene for forbindelser, der ikke er blandt dem, der er opregnet i tabel 1 (ergosterol skal ikke beregnes). Responsfaktoren for α-cholestanol antages at være lig med 1.

Koncentrationen af hver enkelt alkoholforbindelse i mg/kg fedtstof beregnes i efter følgende formel:

$$Alkoholforbindelse\ x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

hvor:

A_x = toparealet for alkoholforbindelsen x i computerenheder.

A_s = toparealet for 1-eicosanol/α-cholestanol i computerenheder.

m_s = massen af tilsat 1-eicosanol/α-cholestanol, i milligram.

m = massen af den prøve, der bruges til bestemmelsen, i gram.

7. ANGIVELSE AF RESULTATER

De enkelte koncentrationer af alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer angives som mg/kg fedtstof, og deres sum som »totalindhold af alifatiske alkoholer«. Totalindholdet er summen af C22, C24, C26 og C28.

Sammensætningen af de enkelte alkoholforbindelser angives med en decimal.

Totalkoncentrationen af sterol angives uden decimaler.

Den procentvise andel af de enkelte steroler beregnes på grundlag af forholdet mellem arealet af den tilsvarende top og summen af sterolernes topareal:

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

hvor:

A_x = toparealet for sterol x.

ΣA = summen af toparealet for steroler.

Tilsyneladende β-sitosterol: Δ5,23-stigmastadienol + clerosterol + β-sitosterol + sitostanol + Δ5-avenasterol + Δ5,24-stigmastadienol.

Den procentvise andel af erytrodiol og uvaol beregnes:

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

hvor:

A_{Er} = areal af erythrodiol i computerenheder.

A_{Uv} = areal af uvaol i computerenheder.

Σ_{AT} = samlet areal for sterol + erythrodiol + uvaol i computerenheder.

Ud over beregningen af den relative andel af de enkelte steroler og triterpendialkoholer og totalkoncentrationen af steroler, skal koncentrationen af erythrodiol og uvaol og deres sum i mg/kg fedtstof beregnes efter følgende formel:

$$Erythrodiol = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$Uvaol = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

hvor:

A_{Er} = topareal af erythrodiol i computerenheder.

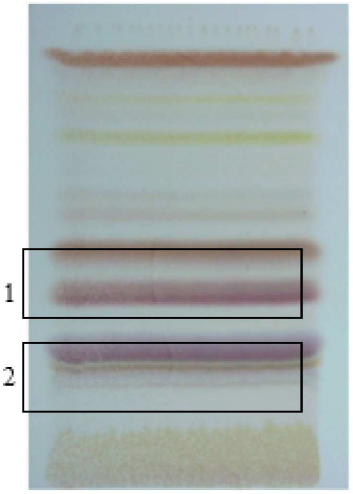
A_{Uv} = areal af uvaol i computerenheder.

A_s = toparealet for α-cholestanol i computerenheder.

m_s = massen af tilsat α-cholestanol i milligram.

m = massen af den prøve, der bruges til bestemmelsen, i gram.

Tillæg



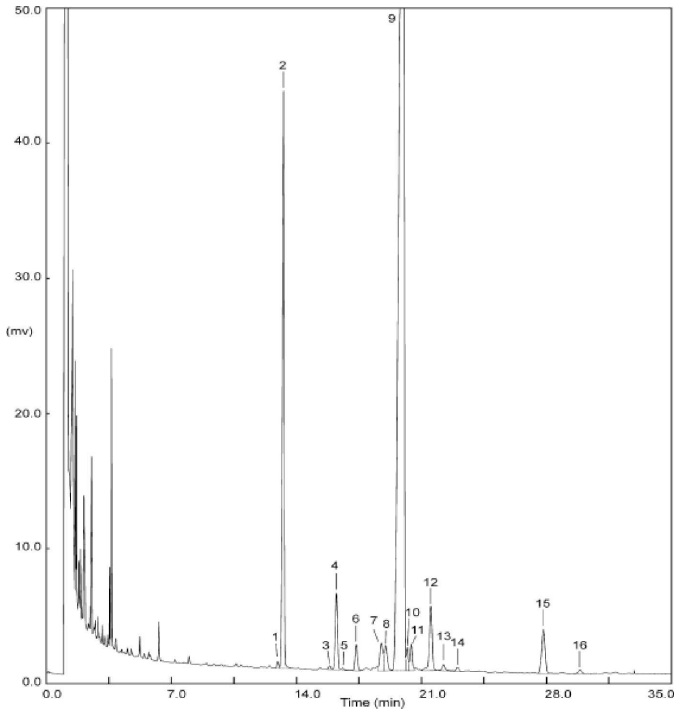
1 Kulbrinter
2 α-Tocopherol
3 Prenoler
4 Triterpenalkoholer
5 Alifatiske alkoholer
6 Methylsteroler
7 Steroler
8 Triterpendialkoholer

Figur 1 — TLC af den uforsæbelige fraktion fra olie af olivenpresserester, elueret to gange med hexan:diethylether (65:35), udviklet med SO4H2 (50 %) og opvarmet. De bånd, der skal skrabes, ses i rektanglet, hvor rektangel 1 er båndene for alifatiske alkoholer og rektangel 2er for steroler og triterpendialkoholer.

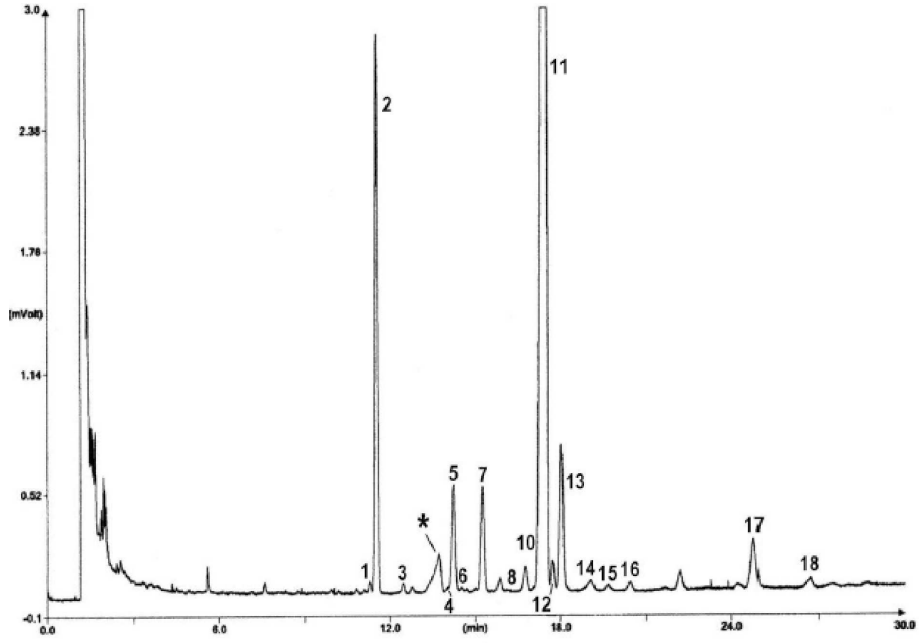
Tabel 1 — Relative retentionstider for steroler

Top	Identifikation		Relativ retentionstid	
			SE 54-kolonne	SE 52-kolonne
1	Cholesterol	Δ-5-cholesten-3ß-ol	0,67	0,63
2	Cholestanol	5α-cholestan-3ß-ol	0,68	0,64
3	Brassicasterol	[24S]-24-methyl-Δ-5,22-cholestadien-3β-ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-methyl-Δ-5,7,22 cholestatrien-3β-ol	0,78	0,76
4	24-methylen-cholesterol	24-methylen-Δ-5,24-cholestadien-3ß-o1	0,82	0,80
5	Campesterol	(24R)-24-methyl-Δ-5-cholesten-3ß-ol	0,83	0,81
6	Campestanol	(24R)-24-methyl-cholestan-3ß-ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	(24S)-24-ethyl-Δ-5,22-cholestadien-3ß-ol	0,88	0,87
8	Δ-7-campesterol	(24R)-24-methyl-Δ-7-cholesten-3ß-ol	0,93	0,92
9	Δ-5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-ethyl-Δ-5,23-cholestadien-3ß-ol	0,95	0,95
10	Clerosterol	(24S)-24-ethyl-Δ-5,25-cholestadien-3ß-ol	0,96	0,96

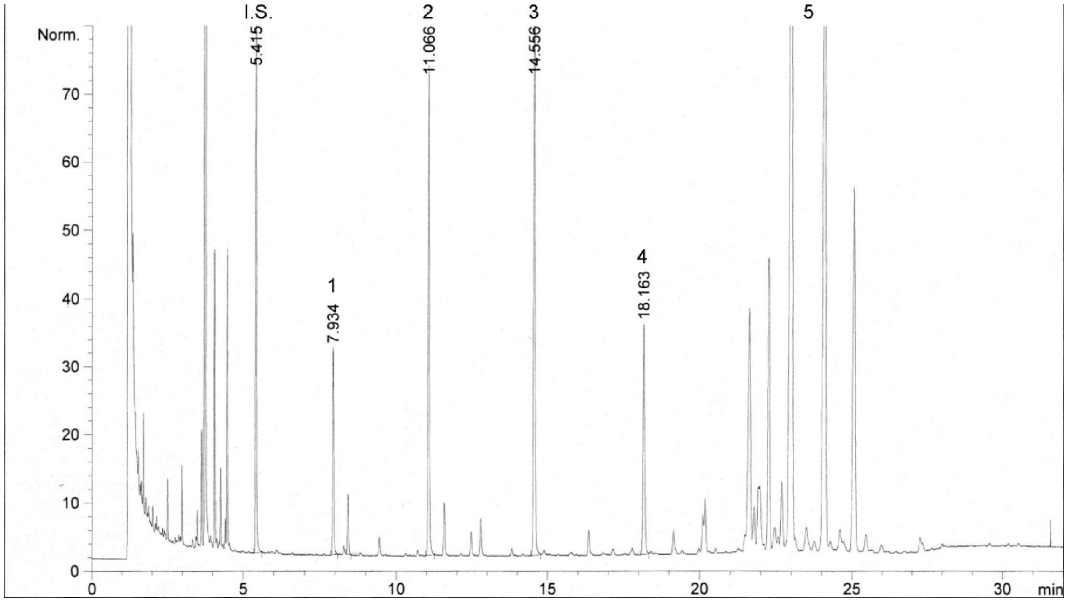
Top	Identifikation		Relativ retentionstid	
			SE 54-kolonne	SE 52-kolonne
11	ß-sitosterol	(24R)-24-ethyl-Δ-5-cholesten-3ß-ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-ethyl-cholestan-3ß-ol	1,02	1,02
13	Δ-5-avenasterol	(24Z)-24-ethyliden-Δ-cholesten-3ß-ol	1,03	1,03
14	Δ-5,24-stigmastadienol	(24R,S)-24-ethyl-Δ-5,24-cholestadien-3ß-ol	1,08	1,08
15	Δ-7-stigmastenol	(24R,S)-24-ethyl-Δ-7-cholesten-3ß-ol	1,12	1,12
16	Δ-7-avenasterol	(24Z)-24-ethyliden-Δ-7-cholesten-3ß-ol	1,16	1,16
17	Erythrodiol	5α-olean-12-en-3β,28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ12-ursen-3β,28-diol	1,52	1,52



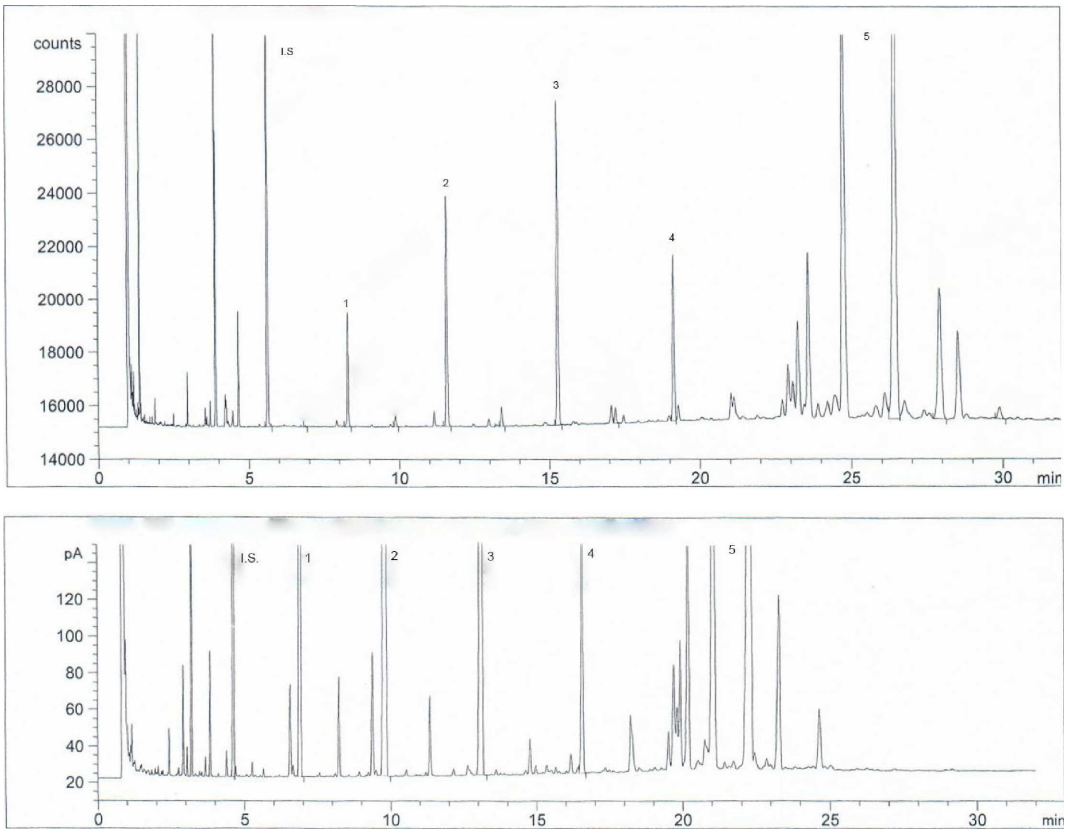
Figur 2 — GC-FID kromatografisk profil for steroler og triterpendialkoholer fra raffineret olivenolie. 1) Cholesterol, 2) α-cholestanol (I.S.), 3) 24-methylencholesterol, 4) campesterol, 5) campestanol, 6) stigmasterol, 7) Δ5,23-stigmastadienol, 8) clerosterol, 9) β-sitosterol, 10) sitostanol, 11) Δ5-avenasterol, 12) Δ5,24-stigmastadienol, 13) Δ7-stigmastenol, 14) Δ7-avenasterol, 15) erythrodiol, 16) uvaol.



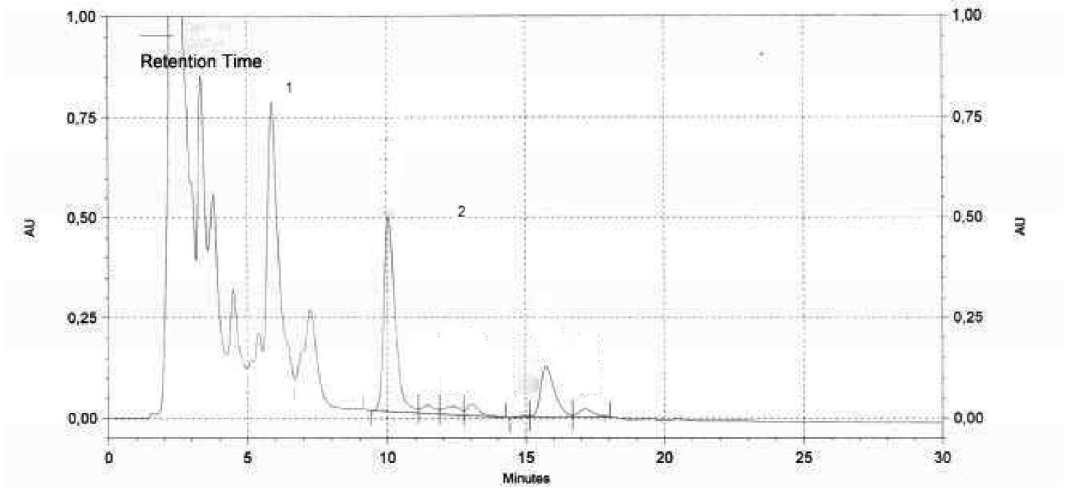
Figur 3 — GC-FID kromatografisk profil for steroler og triterpendialkoholer fra bomolie. 1) Cholesterol, 2) α-cholestanol, 3) brassicasterol, 4) 24-methylencholesterol, 5) campesterol, 6) campestanol, 7) stigmasterol, 8) Δ7-campesterol, 9) Δ5,23-stigmastadienol, 10) clerosterol, 11) β-sitosterol, 12) sitostanol, 13) Δ5-avenasterol, 14) Δ5,24-stigmastadienol, 15) Δ7-stigmastenol, 16) Δ7-avenasterol, 17) erythrodiol, 18) uvaol.



Figur 4 — **G**C-FID kromatografisk profil for alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer fra olivenolie. (I.S.) C20-ol, 1) C22-ol, 2) C24-ol, 3) C26-ol, 4) C28-ol, 5) triterpenalkoholer.



Figur 5 — GC-FID kromatografisk profil for alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer fra en raffineret olivenolie og en olivenolie efter anden centrifugering. (I.S.) C20-ol, 1) C22-ol, 2) C24-ol, 3) C26-ol, 4) C28-ol, 5) tripertenalkoholer.



Figur 6 — HPLC-kromatogram af en olivenolie, uforsæbeligt adskilt gennem HPLC ved hjælp af en UV-detektor. 1) Alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer 2) Steroler og triterpendialkoholer«