KOMMISSIONENS GENOMFÖRANDEFÖRORDNING (EU) 2019/1604

av den 27 september 2019

om ändring av förordning (EEG) nr 2568/91 om egenskaper hos olivolja och olivolja av pressrester och om lämpliga analysmetoder

EUROPEISKA KOMMISSIONEN HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av fördraget om Europeiska unionens funktionssätt,

med beaktande av Europaparlamentets och rådets förordning (EU) nr 1308/2013 av den 17 december 2013 om upprättande av en samlad marknadsordning för jordbruksprodukter och om upphävande av rådets förordningar (EEG) nr 922/72, (EEG) nr 234/79, (EG) nr 1037/2001 och (EG) nr 1234/2007 ([1]), särskilt artikel 91 första stycket led d, och

av följande skäl:

(1) I kommissionens förordning (EEG) nr 2568/91 ([2]) definieras de fysikalisk-kemiska och organoleptiska egenskaperna hos olivolja och olivolja av pressrester samt fastställs metoder för bedömning av dessa egenskaper.

(2) Metoderna och gränsvärdena för oljornas egenskaper uppdateras regelbundet mot bakgrund av synpunkter från kemiska experter och i samstämmighet med Internationella olivrådets (nedan kallat *IOC*) utredningar.

(3) För att säkerställa att de senaste internationella standarder som fastställts av IOC genomförs på unionsnivå bör vissa analysmetoder som fastställs i förordning (EEG) nr 2568/91 uppdateras.

(4) IOC:s handelsnorm har ändrats avseende angivelsen av gränsen för fri syra, peroxidtal, organoleptisk bedömning (defekternas medianvärde och fruktighetens medianvärde) och skillnaden mellan ECN42 (HPLC) och ECN42 (teoretisk beräkning) för att uppnå överensstämmelse med analysmetodens precisionsvärden.

(5) Enligt artikel 2a.5 i förordning (EEG) nr 2568/91 ska medlemsstaterna kontrollera om ett prov av olivolja överensstämmer med den kategori som uppgetts genom kontroll av de egenskaper som anges i bilaga I till den förordningen, antingen i valfri ordning eller i enlighet med den ordning som anges i beslutsschemat i bilaga Ib till den förordningen.

(6) Mot bakgrund av den senaste tidens utveckling är det lämpligt att uppdatera tabellerna i bilaga Ib till förordning (EEG) nr 2568/91 och dess tillägg på lämpligt sätt. Det verkar också som om uttrycket ”flödesschema” är lämpligare än uttrycket ”beslutsschema” med avseende på innehållet i bilaga Ib.

(7) I punkt 9.4 i bilaga XII till förordning (EEG) nr 2568/91 definieras defekternas medianvärde som medianvärdet för den defekt som upplevs mest intensivt. Eftersom olika paneler ska bedöma överensstämmelsen för oljan bör det vid kontrollbedömningar klargöras att det beslut som avser hur väl egenskaperna hos en olja överensstämmer med den angivna kategorin endast gäller medianvärdet för den huvudsakliga defekten, oberoende av dess karaktär.

(8) Förordning (EEG) nr 2568/91 bör därför ändras i enlighet med detta.

(9) De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från kommittén för den samlade marknadsordningen inom jordbruket.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Förordning (EEG) nr 2568/91 ska ändras på följande sätt:

1. Artikel 2 ska ändras på följande sätt:

   a) I punkt 1 ska led l ersättas med följande:

      ”l) För bestämning av sammansättningen och halten av steroler och för bestämning av alkoholföreningar med kapillärgaskromatografi, den metod som anges i bilaga XIX.”

([1]) EUT L 347, 20.12.2013, s. 671.
([2]) Kommissionens förordning (EEG) nr 2568/91 av den 11 juli 1991 om egenskaper hos olivolja och olivolja av pressrester och om lämpliga analysmetoder (EGT L 248, 5.9.1991, s. 1).

b) I punkt 2 ska tredje stycket ersättas med följande:

”Om panelen beträffande de organoleptiska egenskaperna inte bekräftar den kategori som angivits för olivoljan, ska de nationella myndigheterna eller deras företrädare, på begäran av den berörda parten, utan dröjsmål låta andra godkända paneler göra två kontrollbedömningar. Minst en av panelerna ska vara en panel som godkänts av den berörda producentmedlemsstaten. Egenskaperna ska anses överensstämma med de angivna egenskaperna om båda kontrollbedömningarna bekräftar den angivna klassificeringen. Om detta inte är fallet ska klassificeringen, oavsett vilken typ av defekter som fastställs under kontrollbedömningarna, förklaras vara oförenlig med egenskaperna och den berörda parten ska vara ansvarig för kostnaderna för kontrollbedömningarna.”

2. Artikel 2a.5 b ska ersättas med följande:

”b) följa den ordning som anges i flödesschemat i bilaga Ib till dess att man når fram till ett av de beslut som anges i flödesschemat.”

3. Tabellen ”BILAGOR Sammanfattning” ska ersättas med tabellen i bilaga I till den här förordningen.

4. Bilaga I ska ersättas med texten i bilaga II till den här förordningen.

5. Punkt 2.1 i bilaga Ia ska ersättas med följande:

”2.1 Varje partidelprov ska delas upp i laboratorieprover enligt punkt 2.5 i standarden EN ISO 5555 och analyseras enligt ordningsföljden i det flödesschema som anges i bilaga Ib eller i någon annan slumpmässig ordning.”

6. Bilaga Ib ska ersättas med texten i bilaga III till den här förordningen.

7. Bilaga V ska utgå.

8. Punkt 4.2 i bilaga VII ska ersättas med följande:

”4.2 n-hexan (för kromatografi). Hexan får ersättas med isooktan (2,2,4-trimetylpentan för kromatografi), förutsatt att jämförbara precisionsvärden uppnås.”

9. Bilaga XII ska ändras i enlighet med bilaga IV till den här förordningen.

10. Bilaga XVII ska ändras i enlighet med bilaga V till den här förordningen.

11. Bilaga XVIII ska ändras i enlighet med bilaga VI till den här förordningen.

12. Bilaga XIX ska ersättas med texten i bilaga VII till den här förordningen.

13. Punkt 4.2 i bilaga XX ska ersättas med följande:

”4.2 n-hexan, för kromatografi eller bedömning av återstoder. Hexan får ersättas med isooktan (2,2,4-trimetylpentan för kromatografi), förutsatt att jämförbara precisionsvärden uppnås. Lösningsmedel med högre kokpunkt än n-hexan tar längre tid att avdunsta. Dessa är dock att föredra på grund av hexans toxicitet. Renheten ska kontrolleras. Till exempel kan återstoden efter avdunstning av 100 ml lösningsmedel kontrolleras.

VARNING – Ångorna kan fatta eld. Förvaras avskilt från värmekällor, gnistor och öppna lågor. Se till att flaskorna alltid är ordentligt förslutna. Sörj för ordentlig ventilation under användningen. Se till att det inte bildas ångor och undanröj alla eventuella brandrisker, som uppvärmningsapparater och elektriska apparater som inte är tillverkade av brandsäkra material. Ämnet är farligt vid inandning och kan orsaka skador på nervceller. Ångorna får inte inandas. Använd lämplig andningsutrustning vid behov. Undvik kontakt med huden och ögonen.

Isooktan är en brandfarlig vätska som utgör brandfara. Explosionsgränserna i luft är 1,1 % till 6,0 % (volymfraktion). Den är giftig vid förtäring och inandning. Använd ett dragskåp med god ventilation vid hantering av detta lösningsmedel.”

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den tjugonde dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 27 september 2019.

På kommissionens vägnar
Jean-Claude JUNCKER
Ordförande

BILAGA I

”BILAGOR

SAMMANFATTNING

Bilaga I	Egenskaper hos olivolja
Bilaga Ia	Provtagning av olivolja eller olivolja av pressrester som levereras i detaljhandelsförpackningar
Bilaga Ib	Flödesschema för kontroll av huruvida ett prov av olivolja överensstämmer med den kategori som uppgetts
Bilaga II	Bestämning av fria fettsyror, metod vid låg temperatur
Bilaga III	Bestämning av peroxidtalet
Bilaga IV	Bestämning av vaxhalten genom kapillärgaskromatografi
Bilaga VII	Bestämning av procentandelen 2-glycerylmonopalmitat
Bilaga IX	Spektrofotometrisk undersökning i ultraviolett ljus
Bilaga X	Bestämning av fettsyrametylestrar med gaskromatografi
Bilaga XI	Bestämning av halten flyktiga halogenerade lösningsmedel i olivolja
Bilaga XII	Internationella olivoljerådets metod för organoleptisk bedömning av jungfruolja
Bilaga XV	Oljehalt i pressrester av oliver
Bilaga XVI	Bestämning av jodtal
Bilaga XVII	Metod för bestämning av stigmastadiener i vegetabiliska oljor
Bilaga XVIII	Bestämning av skillnaden mellan faktiskt och teoretiskt innehåll av triglycerider med ECN 42
Bilaga XIX	Bestämning av sammansättningen och halten av steroler och alkoholföreningar genom kapillärgaskromatografi
Bilaga XX	Metod för bestämning av halter av vaxer, fettsyreetylestrar och fettsyremetylestrar genom kapillärgaskromatografi
Bilaga XXI	Resultat av kontroller av överensstämmelse som utförs på olivolja enligt artikel 8.2”

BILAGA II

”BILAGA I

EGENSKAPER HOS OLIVOLJA

Kvalitetsegenskaper

Kategori	Syrahalt (%) (*)	Peroxidtal (mEq O_2/kg)	K_{232}	K_{268} eller K_{270}	Delta-K	Organoleptisk bedömning		Fettsyraetylestrar (mg/kg)
						Defekternas medianvärde (Md) (*)	Medianvärde för fruktighet (Mf)	
1. Extra jungfruolja	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Jungfruolja	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Bomolja	> 2,0	—	—	—	—	Md> 3,5 (1)	—	—
4. Raffinerad olivolja	≤ 0,30	≤ 5,0	_	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Olivolja bestående av raffinerad olivolja och jungfruolja	≤ 1,00	≤ 15,0	_	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Oraffinerad olivolja av pressrester	—	—	—	—	—		—	—
7. Raffinerad olivolja av pressrester	≤ 0,30	≤ 5,0	_	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Olivolja av pressrester	≤ 1,00	≤ 15,0	_	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(1) Medianvärdet för defekter kan vara lägre än eller lika med 3,5 när medianvärdet för fruktighet är lika med 0,0.

Renhetsegenskaper

Kategori	Fettsyrasammansättning (1)						Totalt transoleinisomerer (%)	Totalt isomerer av translinolsyra + isomerer av translinolensyra (%)	Stigmastadiener (mg/kg)\ (2)	Skillnad: ECN 42 (HPLC) och ECN 42 (teoretisk beräkning)	2-glycerylmonopalmitat (%)
	Myristinsyra (%)	Linolensyra (%)	Eikosansyra (arakinsyra) (%)	Eikosensyra (%)	Behensyra (%)	syra (%)					
1. Extra jungfruolja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9 om totalhalten palmitinsyra ≤ 14,00 % ≤ 1,0 om totalhalten palmitinsyra > 14,00 %
2. Jungfruolja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9 om totalhalten palmitinsyra ≤ 14,00 % ≤ 1,0 om totalhalten palmitinsyra > 14,00 %
3. Bomolja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9 om totalhalten palmitinsyra ≤ 14,00 % ≤ 1,1 om totalhalten palmitinsyra > 14,00 %
4. Raffinerad olivolja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9 om totalhalten palmitinsyra ≤ 14,00 % ≤ 1,1 om totalhalten palmitinsyra > 14,00 %
5. Olivolja bestående av raffinerad olivolja och jungfruolja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9 om totalhalten palmitinsyra ≤ 14,00 % ≤ 1,0 om totalhalten palmitinsyra > 14,00 %
6. Oraffinerad olivolja av pressrester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Raffinerad olivolja av pressrester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Olivolja av pressrester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

(1) Halt av övriga fettsyror (%): palmitinsyra: 7,50–20,00; palmitoleinsyra: 0,30–3,50; heptadekansyra: ≤ 0,40; heptadekensyra: ≤ 0,60; stearinsyra: 0,50–5,00; oljesyra: 55,00–83,00; linolsyra: 2,50–21,00.

(2) Totalvärde för isomerer som kan (eller inte kan) separeras på kapillärkolonn.

Kategori	Sterolsammansättning						Totalhalt steroler (mg/kg)	Erytrodiol och uvaol (%) (**)	Vaxer (mg/kg) (**)
	Kolesterol (%)	Brassikasterol (%)	Kampesterol (1) (%)	Stigmasterol (%)	App. β–sitosterol (2) (%)	Delta-7-stigmastenol (1) (%)			
1. Extra jungfruolja	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Jungfruolja	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Bomolja	≤ 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. Raffinerad olivolja	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Olivolja bestående av raffinerad olivolja och jungfruolja	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Oraffinerad olivolja av pressrester	≤ 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. Raffinerad olivolja av pressrester	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Olivolja av pressrester	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

(1) Se tillägget till denna bilaga.

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

(3) Olja med en vaxhalt mellan 300 mg/kg och 350 mg/kg betraktas som bomolja om totalhalten alifatiska alkoholer är lägre än eller lika med 350 mg/kg eller om halten erytrodiol och uvaol är lägre än eller lika med 3,5 %.

(4) Olja med en vaxhalt mellan 300 mg/kg och 350 mg/kg betraktas som oraffinerad olivolja av pressrester om totalhalten alifatiska alkoholer är högre än 350 mg/kg och om halten erytrodiol och uvaol är högre än 3,5 %.

Anmärkningar:

a) Analysresultaten ska anges med samma antal decimaler som anges för varje egenskap. Den sista siffran ska avrundas uppåt om efterföljande siffra är högre än 4.

b) Det räcker med att en enda av egenskaperna inte motsvarar det angivna värdet för att en olja ska klassas i en annan kategori eller förklaras ej uppfylla kraven enligt denna förordning.

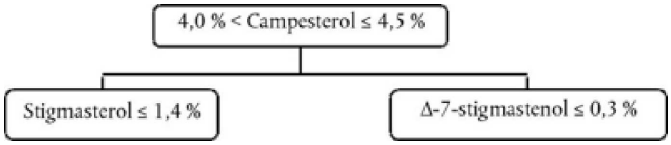
c) För jungfruolja kan de båda kvalitetsegenskaper som är markerade med en asterisk (*) samtidigt skilja sig åt från de gränsvärden som fastställts för den kategorin.

d) Egenskaper markerade med två asterisker (**) anger, för oraffinerad olivolja av pressrester, att båda gränsvärdena samtidigt får skilja sig från de angivna värdena. För olivolja av pressrester och raffinerad olivolja av pressrester får ett av gränsvärdena skilja sig från de angivna värdena.

Tillägg

Beslutsscheman

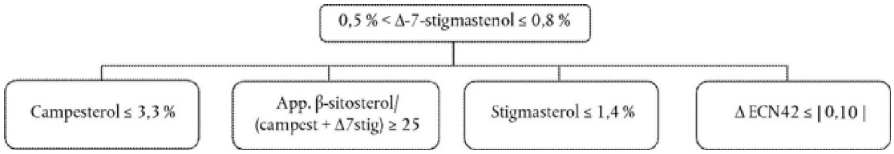
Beslutsschema avseende **kampesterol** för jungfruolja och extra jungfruolja:



Övriga parametrar ska uppfylla de gränsvärden som fastställs i denna förordning.

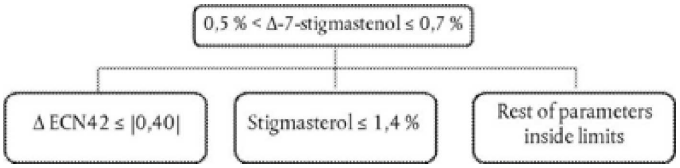
Beslutsschema avseende **delta-7-stigmastenol** för

— Extra jungfruolja och jungfruolja



Övriga parametrar ska uppfylla de gränsvärden som fastställs i denna förordning.

— Olivolja av pressrester (oraffinerad och raffinerad)



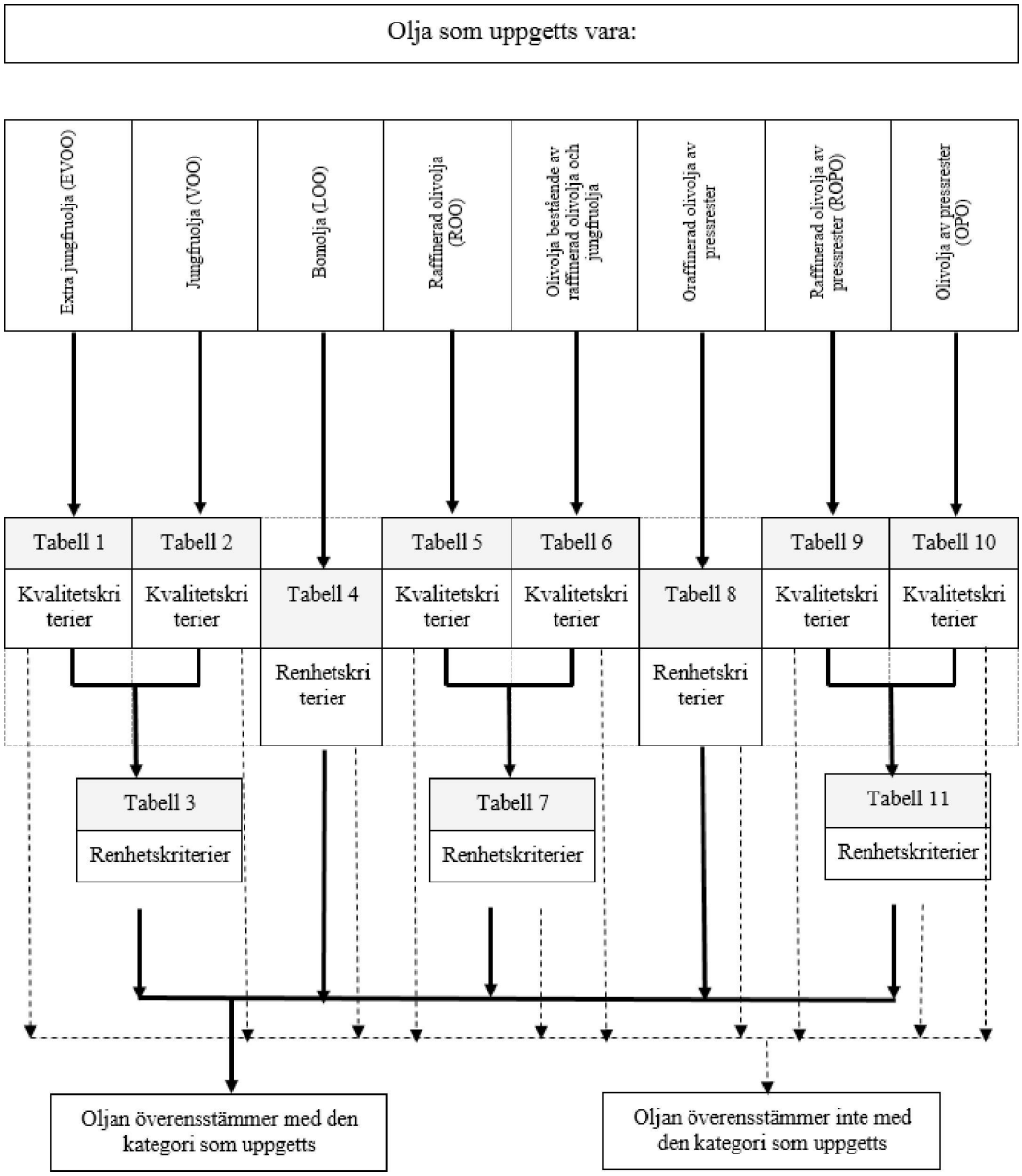
Övriga parametrar ska uppfylla de gränsvärden som fastställs i denna förordning.”

BILAGA III

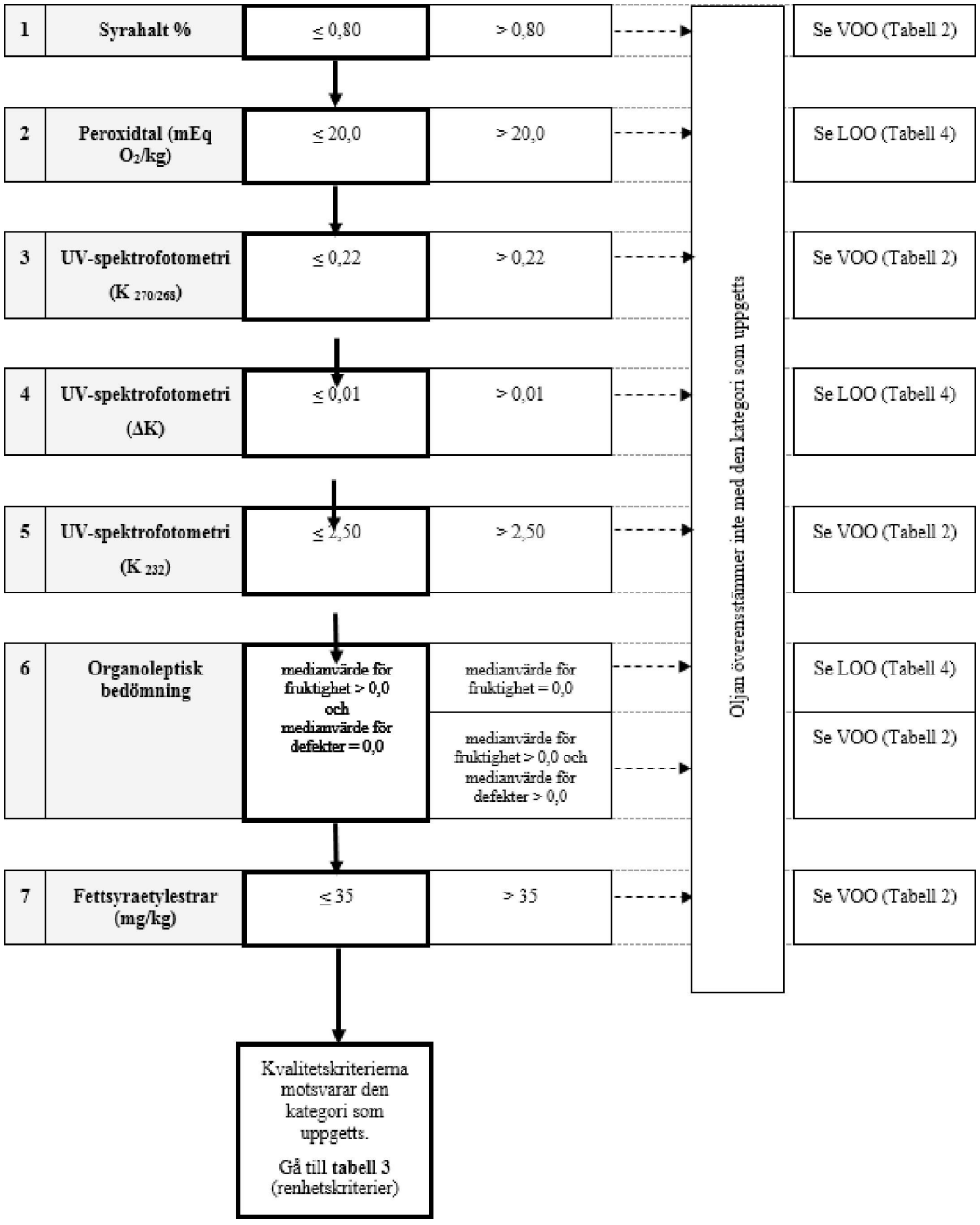
”BILAGA Ib

FLÖDESSCHEMA FÖR KONTROLL AV HURUVIDA ETT PROV AV OLIVOLJA ÖVERENSSTÄMMER MED DEN KATEGORI SOM UPPGETTS

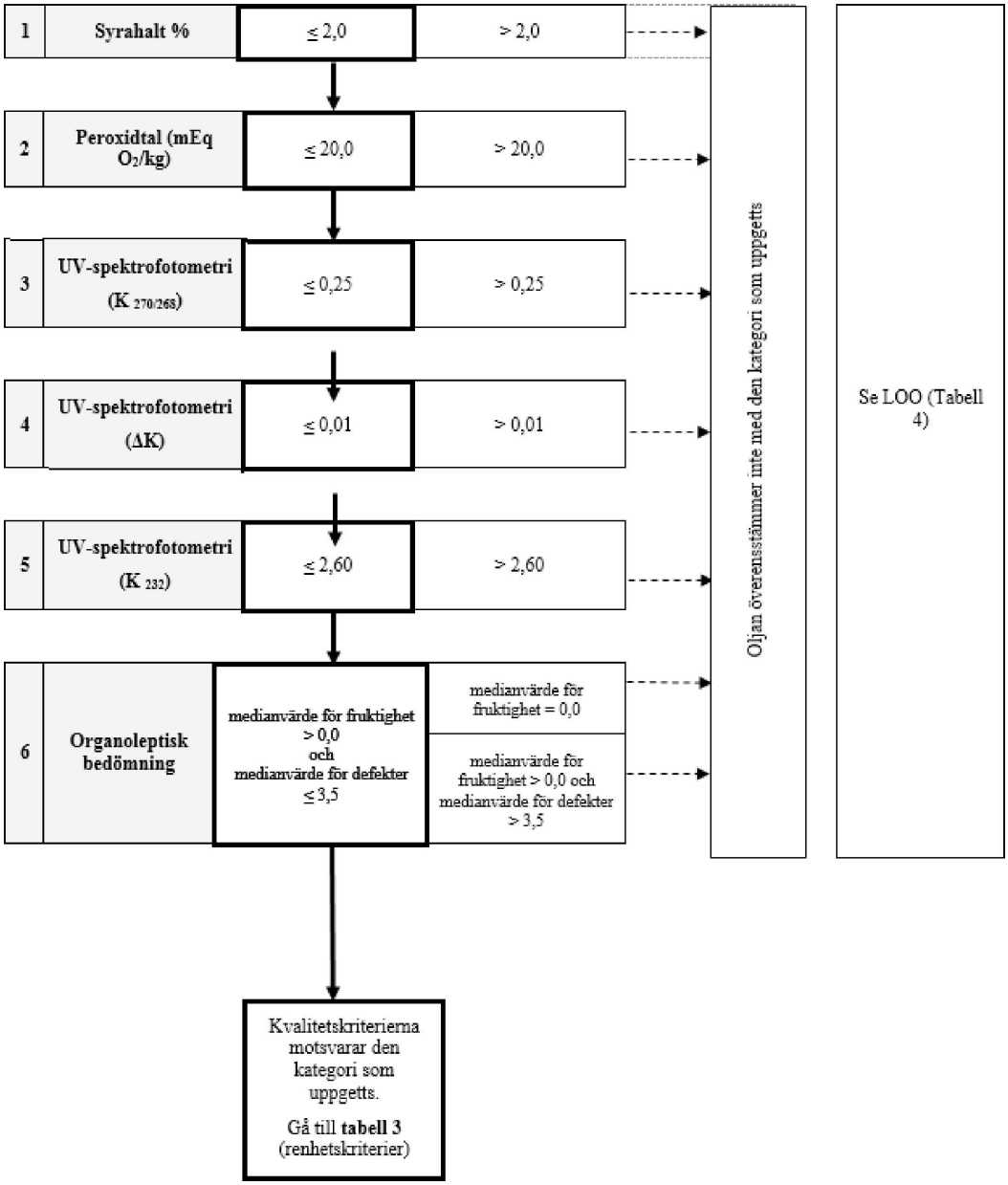
Översiktstabell



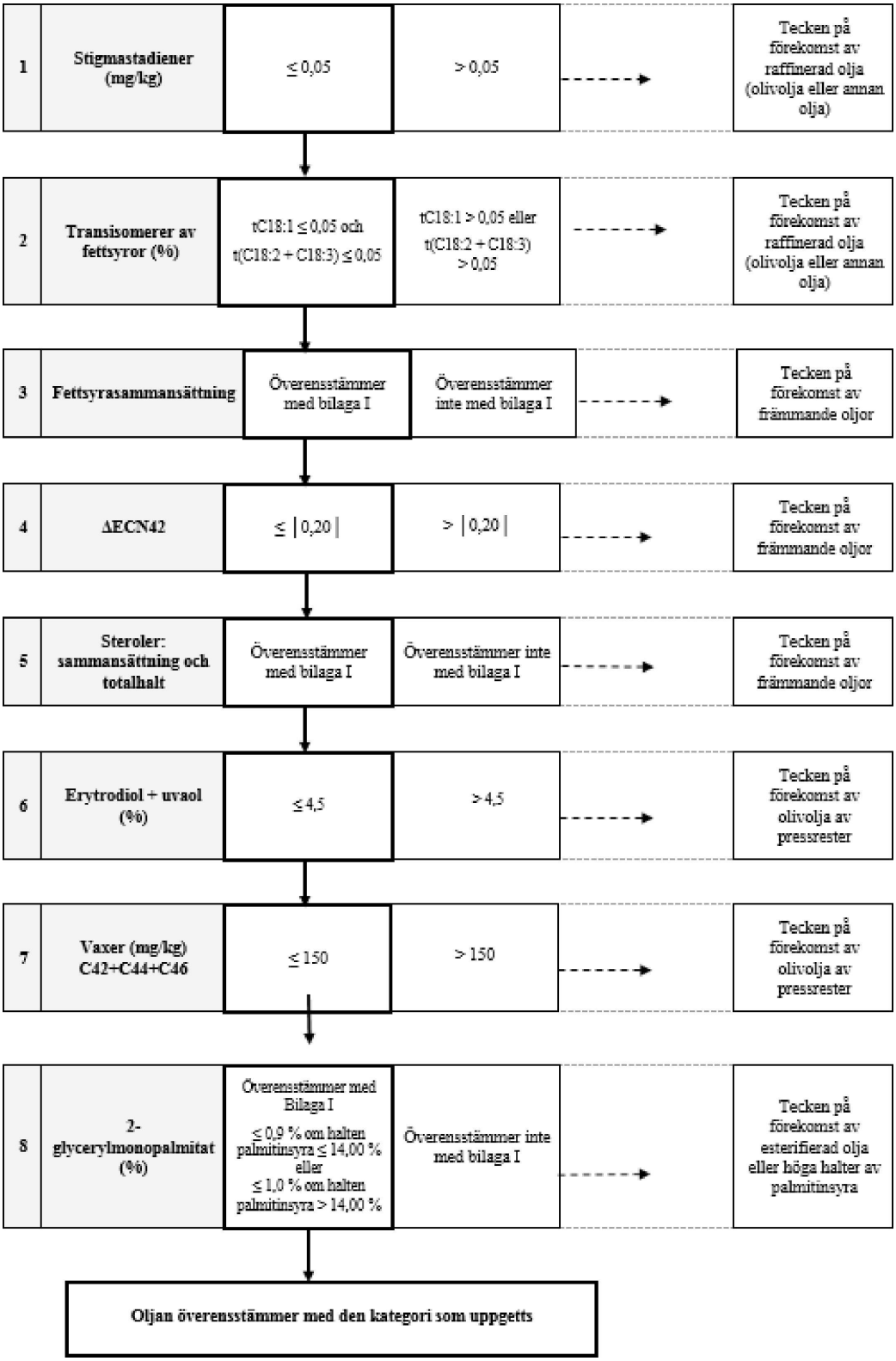
Tabell 1 – Extra jungfruolja – Kvalitetskriterier



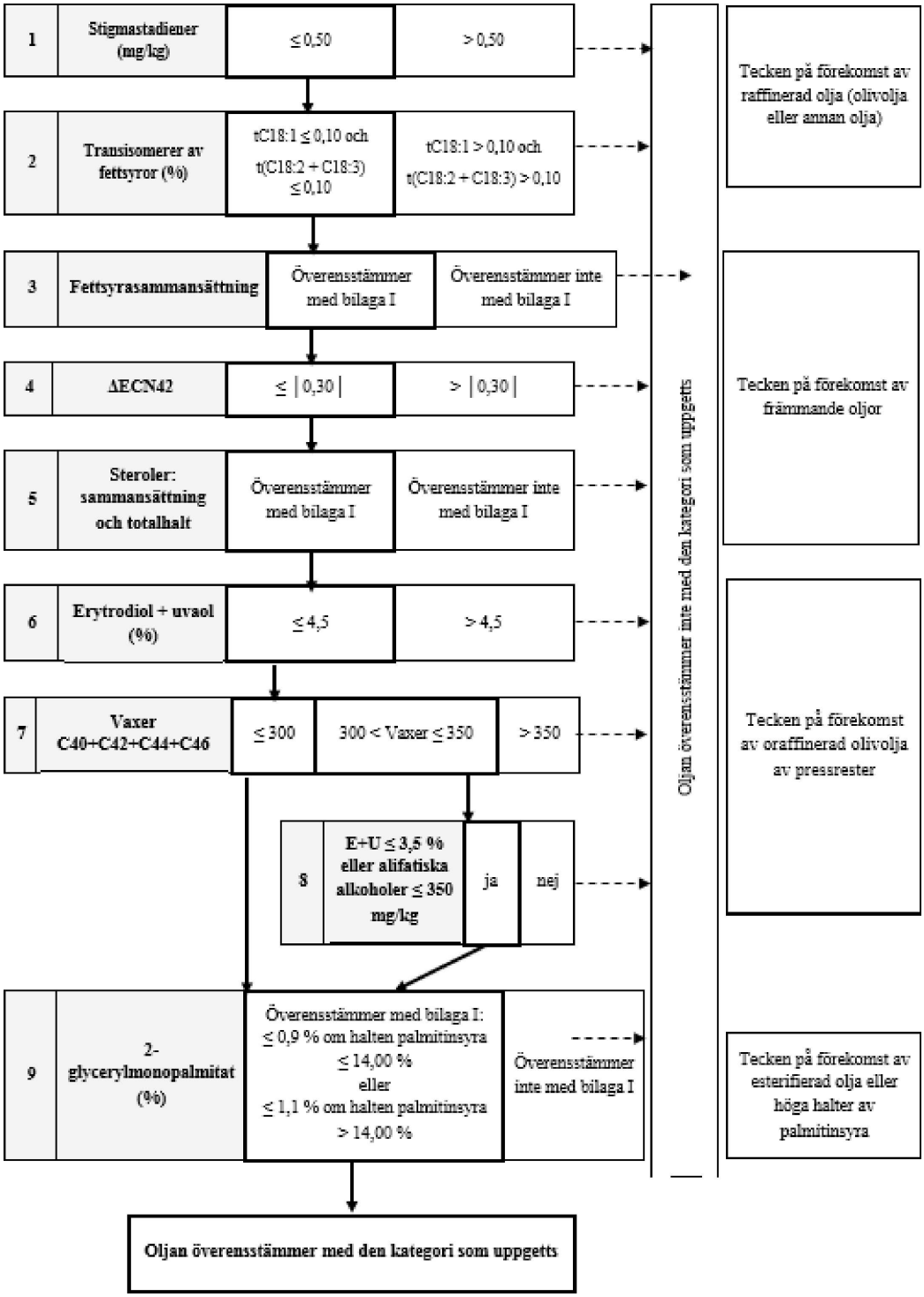
Tabell 2 – Jungfruolja – Kvalitetskriterier



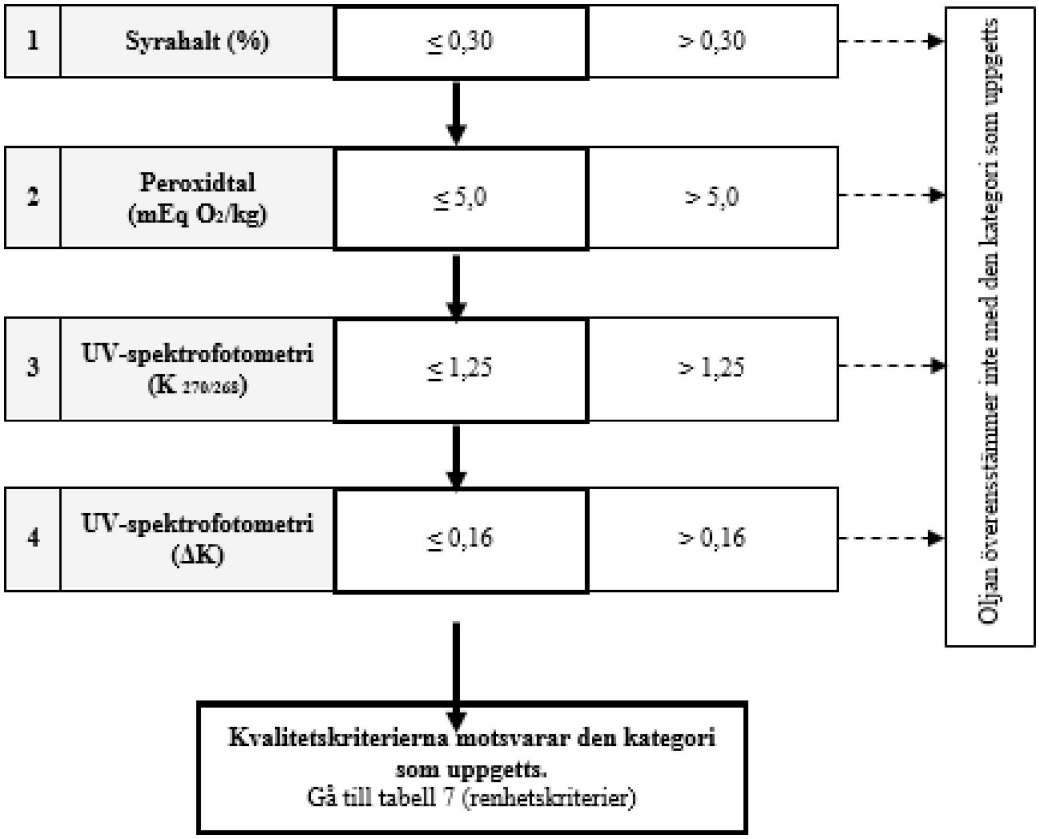
Tabell 3 – Extra jungfruolja och jungfruolja – Renhetskriterier



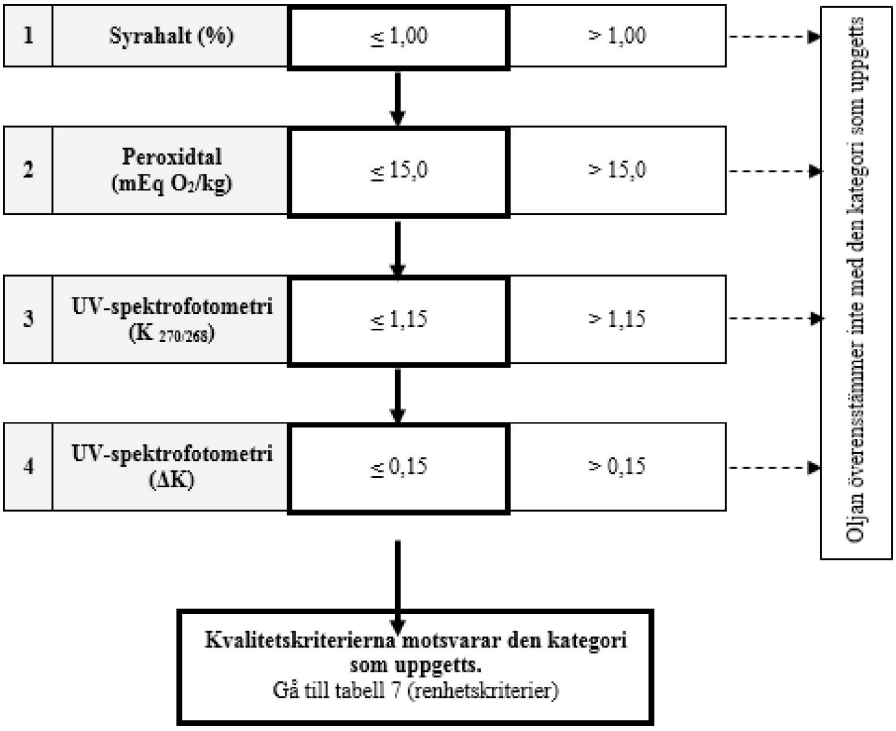
Tabell 4 – Bomolja – Renhetskriterier



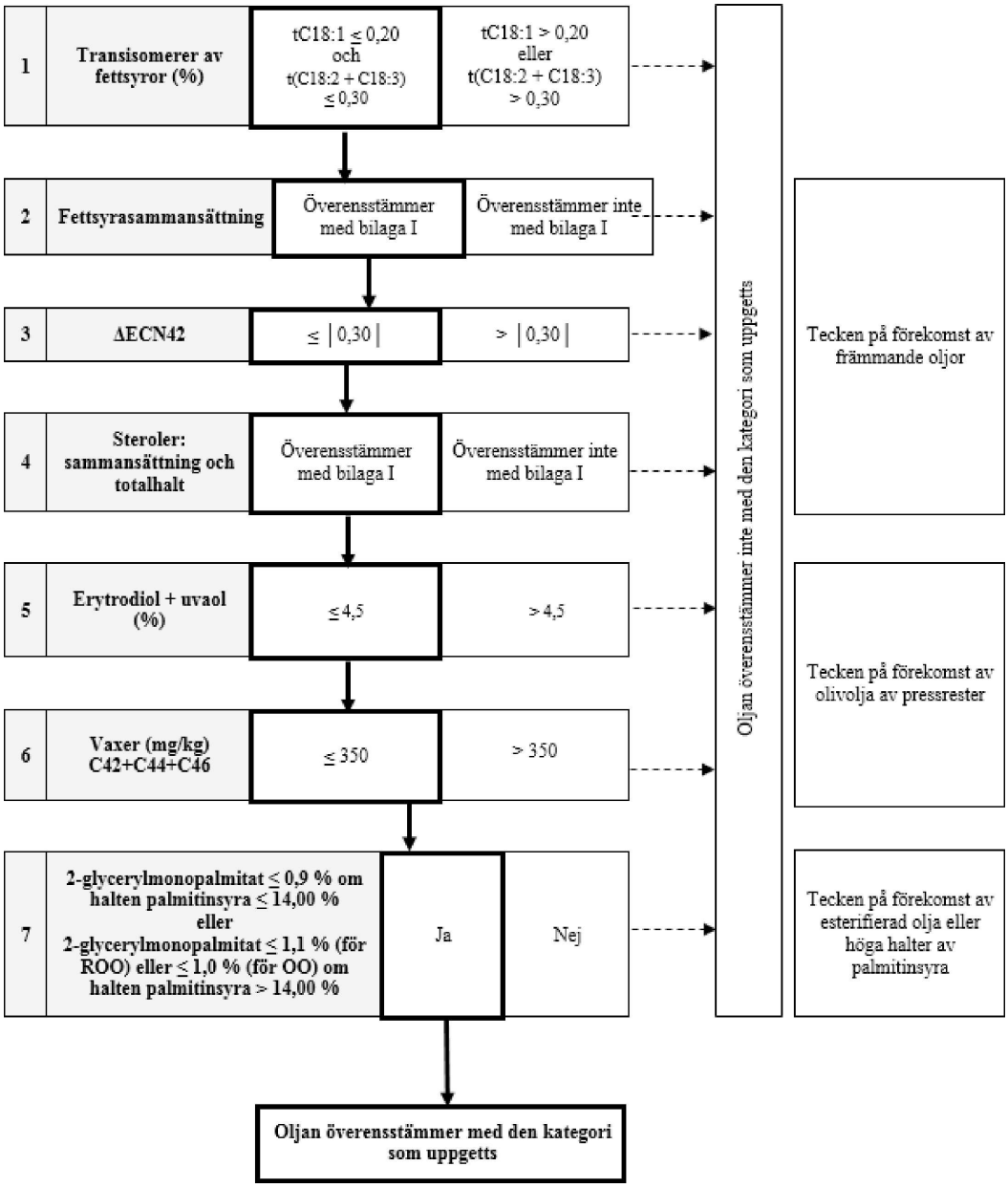
Tabell 5 – Raffinerad olivolja – Kvalitetskriterier



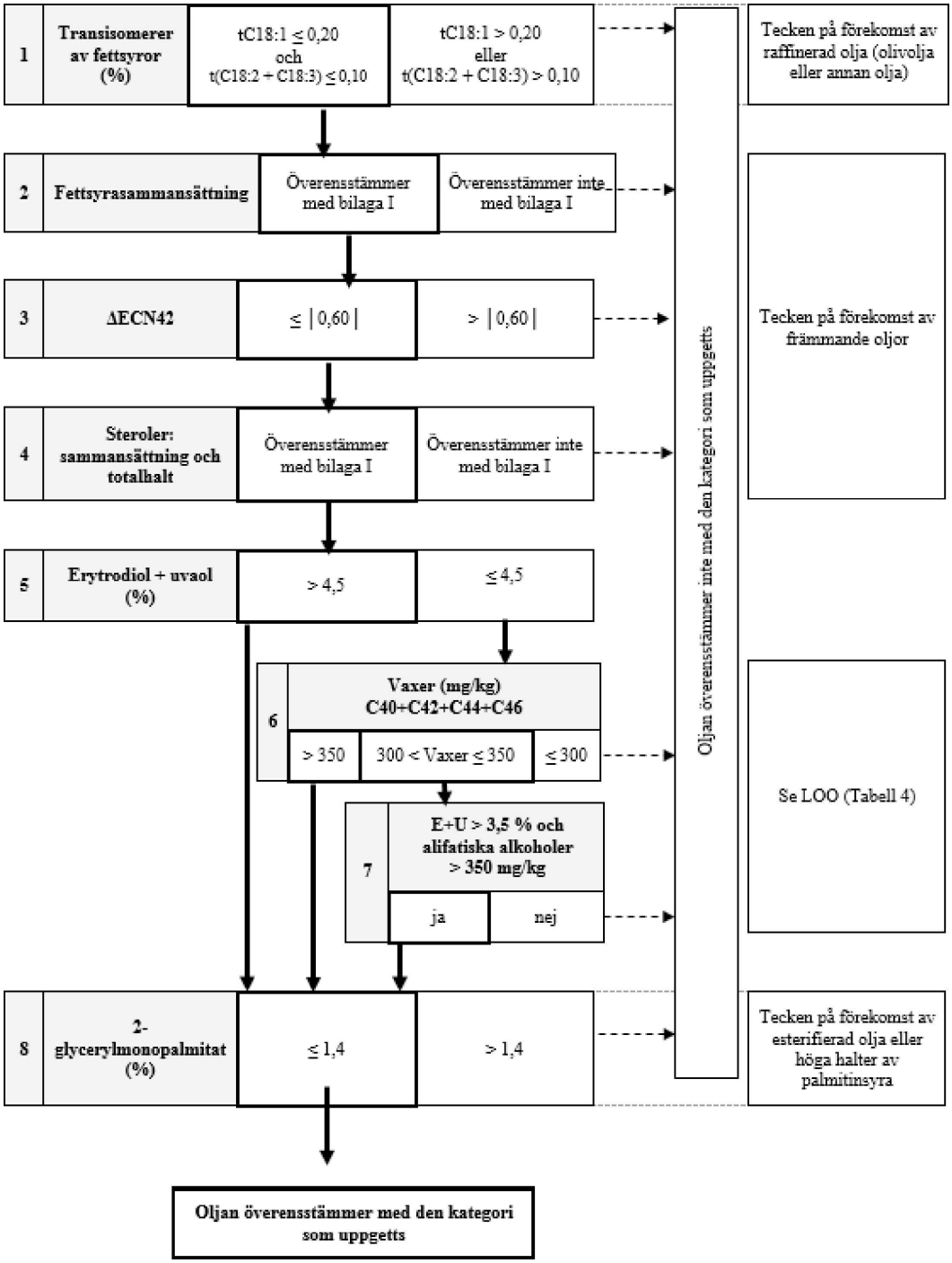
Tabell 6 – Olivolja bestående av raffinerad olivolja och jungfruolja – Kvalitetskriterier



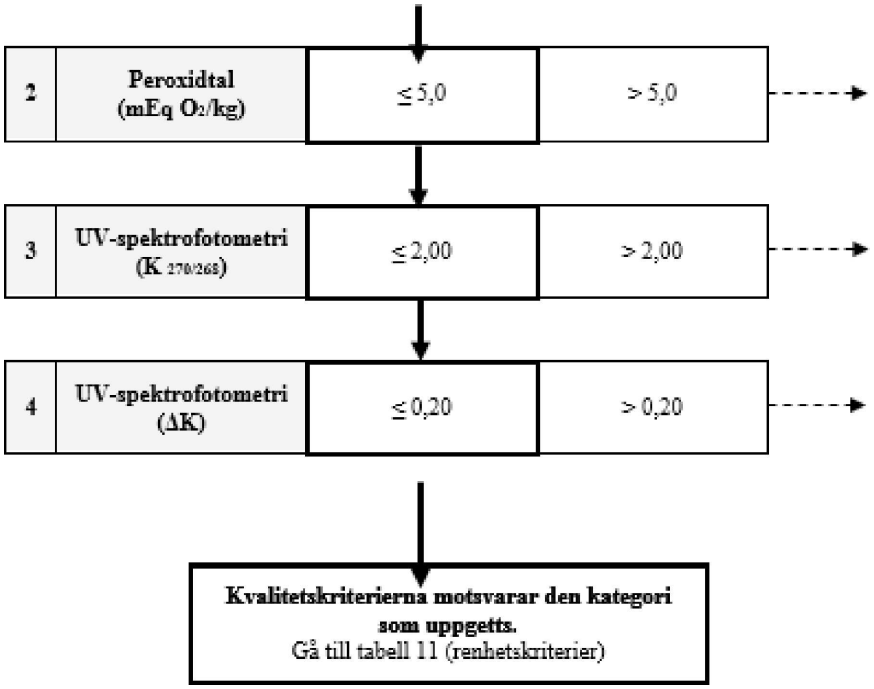
Tabell 7 – Raffinerad olivolja och olivolja bestående av raffinerad olivolja och jungfruolja – Renhetskriterier



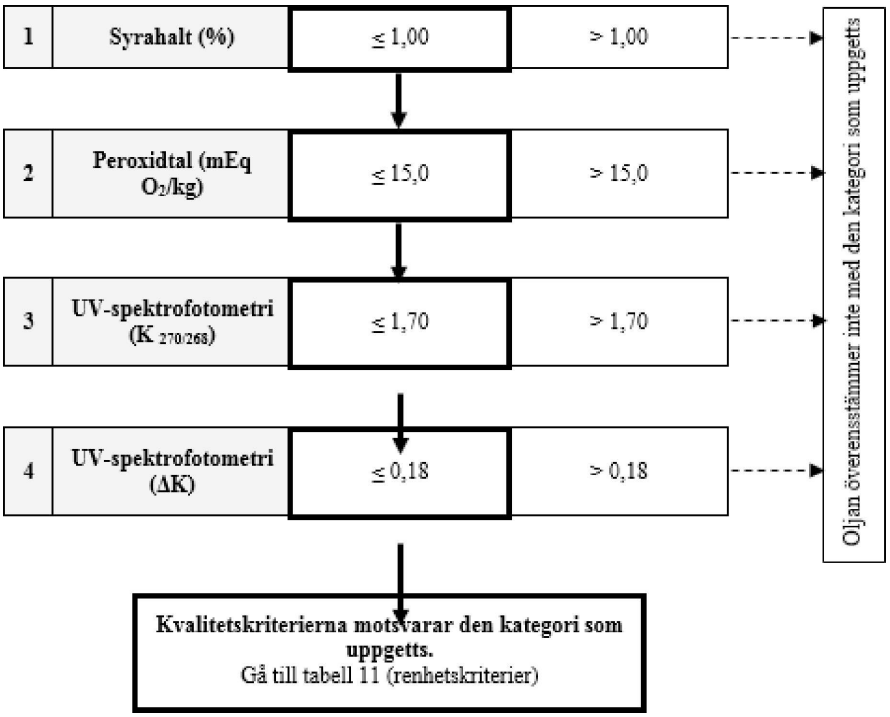
Tabell 8 – Oraffinerad olivolja av pressrester – Renhetskriterier



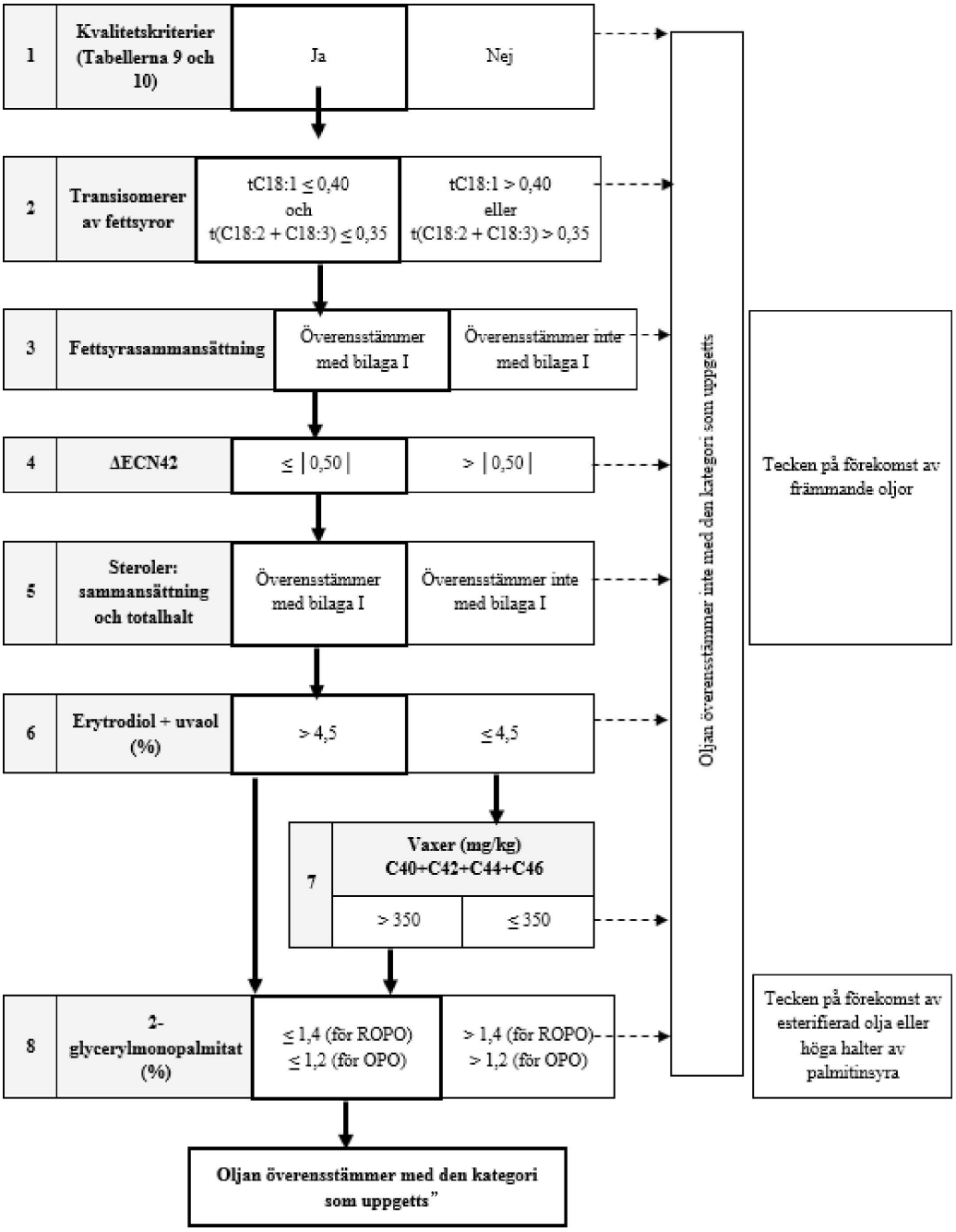
Tabell 9 – Raffinerad olivolja av pressrester – Kvalitetskriterier



Tabell 10 – Olivolja av pressrester – Kvalitetskriterier



Tabell 11 – Raffinerad olivolja av pressrester och olivolja av pressrester – Renhetskriterier



BILAGA IV

Bilaga XII ska ändras på följande sätt:

1. Punkt 3.3 ska ersättas med följande:

”3.3 **Frivillig terminologi för märkning**

Den som leder panelen får på begäran intyga att de oljor som bedömts överensstämma med definitioner och intervall som endast motsvarar följande termer med avseende på egenskapernas intensitet och förnimmelsen av dem.

Positiva egenskaper (fruktig, bitter och skarp): Enligt förnimmelsens intensitet:

— *Stark*, om medianvärdet för egenskapen är högre än 6,0.

— *Medelstark*, om medianvärdet för egenskapen är högre än 3,0 men lägre än eller lika med 6,0.

— *Svag*, om medianvärdet för egenskapen är lägre än eller lika med 3,0.

Fruktighet	En uppsättning olfaktoriska förnimmelser som är kännetecknande för oljan och som beror på sorten och kommer från friska, färska oliver i vilka varken grön eller mogen fruktighet dominerar. Den förnims direkt och/eller via näsans bakre gångar.
Omogen fruktighet	En uppsättning olfaktoriska förnimmelser som är kännetecknande för oljan och som påminner om omogna frukter och som beror på sorten och kommer från omogna, friska, färska oliver. Den förnims direkt och/eller via näsans bakre gångar.
Mogen fruktighet	En uppsättning olfaktoriska förnimmelser som är kännetecknande för oljan och som påminner om mogna frukter och som beror på sorten och kommer från friska, färska oliver. Den förnims direkt och/eller via näsans bakre gångar.
Välbalanserad	Olja som inte är obalanserad i fråga om de olfaktoriska-smakmässiga och taktila intrycken där medianvärdet för egenskaperna bitter och/eller skarp inte är mer än 2,0 poäng högre än medianvärdet för fruktighet.
Mild olja	Olja för vilken medianvärdet för egenskaperna bitter och skarp är 2,0 eller lägre.

Förteckning över termer som avser förnimmelsens intensitet:

Termer som får användas om ett intyg från en organoleptisk provning kan visas upp	Medianvärde för egenskapen
Fruktighet	—
Mogen fruktighet	—
Omogen fruktighet	—
Mild fruktighet	≤ 3,0
Medelfruktighet	3,0 < Me ≤ 6,0
Kraftig fruktighet	> 6,0
Svagt mogen fruktighet	≤ 3,0
Medelmogen fruktighet	3,0 < Me ≤ 6,0
Kraftig mogen fruktighet	> 6,0
Svag omogen fruktighet	≤ 3,0
Medelomogen fruktighet	3,0 < Me ≤ 6,0
Kraftig omogen fruktighet	> 6,0

Termer som får användas om ett intyg från en organoleptisk provning kan visas upp	Medianvärde för egenskapen
Svag bitterhet	≤ 3,0
Medelbitter	3,0 < Me ≤ 6,0
Kraftig bitterhet	> 6,0
Kraftigt stark	≤ 3,0
Medelstark	3,0 < Me ≤ 6,0
Kraftigt stark	> 6,0
Välbalanserad olja	Medianvärdet för egenskaperna bitter och skarp är inte mer än 2,0 poäng högre än medianvärdet för fruktighet.
Mild olja	Medianvärdet för egenskaperna bitter och skarp är 2,0 eller lägre.”

(2) Punkt 9.4 ska ersättas med följande:

”9.4 **Klassificering av oljan**

Oljan ska klassificeras enligt följande kategorier, med defekternas medianvärde och fruktighetens medianvärde som utgångspunkt. Defekternas medianvärde definieras som medianvärdet för den defekt som upplevs mest intensivt. Defekternas medianvärde och medianvärdet för egenskapen fruktighet anges med en decimal.

Klassificeringen av oljan sker genom att defekternas medianvärde och medianvärdet för egenskapen fruktighet jämförs med de referensintervall som anges nedan. Då gränsvärdena för dessa intervall har fastställts med beaktande av metodens felmarginal anses de vara absoluta. Genom programvaran kan klassificeringen visas grafiskt eller i en tabell med statistiska uppgifter.

a) Extra jungfruolja: defekternas medianvärde är 0,0 och medianvärdet för egenskapen fruktighet är högre än 0,0.

b) Jungfruolja: defekternas medianvärde är högre än 0,0 men högst 3,5 och medianvärdet för egenskapen fruktighet är högre än 0,0.

c) Bomolja: defekternas medianvärde är högre än 3,5 eller defekternas medianvärde är lägre än eller lika med 3,5 och medianvärdet för fruktighet är 0,0.

Anmärkning 1: När medianvärdet för egenskapen bitter och/eller skarp är högre än 5,0 ska panelledaren ange detta på provningsintyget.

För bedömningar som syftar till att kontrollera överensstämmelse ska en provning utföras. Vid kontrollbedömningar ska bedömningen utföras dubbelt i olika sessioner. Analysresultaten från kontrollbedömningen ska vara statistiskt homogena. (Se punkt 9.5). Om så inte är fallet måste två nya kontrollbedömningar göras. Det slutgiltiga medianvärdet för klassificeringsegenskaperna ska beräknas som ett medelvärde av båda medianvärdena.”

BILAGA V

Bilaga XVII ska ändras på följande sätt:

(1) Punkt 5.1 ska ersättas med följande:

"5.1 Hexan eller blandningar av alkaner med ett kokpunktsintervall på 65–70 °C, destillerat med rektifieringskolonn. Hexan får ersättas med isooktan (2,2,4-trimetylpentan för kromatografi), förutsatt att jämförbara precisionsvärden uppnås. Återstoden efter avdunstning av 100 ml lösningsmedel kan kontrolleras. Lösningsmedel med högre kokpunkt än n-hexan tar längre tid att avdunsta. Dessa är dock att föredra på grund av hexans toxicitet."

(2) I punkt 6.3.3 ska följande text läggas till:

"Anmärkning 10. När stigmastadiener förekommer i koncentrationer som överstiger 4 mg/kg, om kvantifiering krävs, ska Internationella olivoljerådets metod för bestämning av sterener i raffinerad olja tillämpas."

BILAGA VI

Bilaga XVIII ska ändras på följande sätt:

(1) Punkt 4.2.1 ska ersättas med följande:

"4.2.1 Petroleumeter 40–60 °C, av kromatografisk renhet, eller hexan. Hexan får ersättas med isooktan (2,2,4-trimetylpentan för kromatografi), förutsatt att jämförbara precisionsvärden uppnås. Lösningsmedel med högre kokpunkt än n-hexan tar längre tid att avdunsta. Dessa är dock att föredra på grund av hexans toxicitet."

(2) Följande punkt ska läggas till som punkt 4.2.12:

"4.2.12 Heptan, av kromatografisk kvalitet. Heptan får ersättas med isooktan (2,2,4-trimetylpentan för kromatografi)."

BILAGA VII

"BILAGA XIX

BESTÄMNING AV SAMMANSÄTTNINGEN OCH HALTEN AV STEROLER OCH ALKOHOLFÖRENINGAR GENOM KAPILLÄRGASKROMATOGRAFI

1. TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Genom metoden beskrivs ett förfarande för bestämning av det enskilda och totala innehållet av alkoholföreningar i olivoljor och olivoljor av pressrester och i blandningar av dessa två oljor.

Alkoholföreningar i olivoljor och olivoljor av pressrester omfattar alifatiska alkoholer, steroler och triterpendialkoholer.

2. PRINCIP

Oljor med tillsats av α-kolestanol och 1-eicosanol som intern standard förtvålas med kaliumhydroxid i etanollösning varefter de oförtvålbara ämnena extraheras med etyleter.

De olika alkoholföreningarnas fraktioner separeras från de oförtvålbara ämnena genom tunnskiktskromatografi på en basisk kiselgelplatta (referensmetod) eller genom vätskekromatografi (HPLC) på kiselgelkolonn. Den fraktion som återvinns från separation av kiselgelen överförs till trimetylsilyletrar och analyseras därefter genom kapillärgaskromatografi.

DEL 1

BEREDNING AV OFÖRTVÅLBARA ÄMNEN

1. TILLÄMPNINGSOMRÅDE

I denna del beskrivs beredning och extraktion av oförtvålbara ämnen. Det omfattar beredning och extraktion av oförtvålbara ämnen från olivoljor och olivoljor av pressrester.

2. PRINCIP

En provmängd förtvålas genom kokning under återflöde med kaliumhydroxid i etanollösning. De oförtvålbara ämnena extraheras med dietyleter.

3. UTRUSTNING

Sedvanlig laboratorieutrustning, i synnerhet följande:

3.1 Rundkolv med återloppskylare med slipade anslutningsfogar, 250 ml.

3.2 Separertratt, 500 ml.

3.3 Kolvar, 250 ml.

3.4 Mikrosprutor, 100 µl och 500 µl.

3.5 En cylindrisk filtrertratt med poröst membran G 3 (porositet 15–40 µm), med en diameter på ca 2 cm och ett djup på 5 cm, som passar för vakuumfiltrering, med hanslipning.

3.6 E-kolv med honslipning, 50 ml, som kan användas för filtrertratten (punkt 3.5).

3.7 Provrör med konisk botten och glaspropp, 10 ml.

3.8 Exsickator med kalciumklorid.

4. REAGENSER

4.1 Kaliumhydroxid, minst 85 %.

4.2 Kaliumhydroxid i etanollösning, ca 2 M.

Lös 130 g kaliumhydroxid (punkt 4.1) under kylning i 200 ml destillerat vatten och späd sedan till 1 liter med etanol (punkt 4.7). Förvara lösningen i väl tillslutna, mörka flaskor som lagras i högst två dagar.

4.3 Etyleter, av analyskvalitet.

4.4 Vattenfritt natriumsulfat, av analyskvalitet.

4.5 Aceton, av kromatografisk kvalitet.

4.6 Etyleter, av kromatografisk kvalitet.

4.7 Etanol, av analyskvalitet.

4.8 Etylacetat, av analyskvalitet.

4.9 Intern standard, α-kolestanol, renhet över 99 % (renheten måste kontrolleras genom analys med gaskromatografi).

4.10 α-kolestanol som intern standard, 0,2 % lösning (m/V) i etylacetat (punkt 4.8).

4.11 Fenolftaleinlösning, 10 g/l i etanol (punkt 4.7).

4.12 En 0,1 % (m/v) lösning av 1-eicosanol i etylacetat (intern standard).

5. FÖRFARANDE

Med hjälp av en 500 µl mikrospruta (punkt 3.4) införs i 250 ml kolven (punkt 3.1) en volym α-kolestanollösning som intern standard (punkt 4.10) och en volym 1-eicosanol (punkt 4.12) innehållande en mängd kolestanol och eicosanol motsvarande ca 10 % av sterol- och alkoholhalten i provet. För olivolja tillsätts exempelvis 500 µl α-kolestanollösning (punkt 4.10) och 250 µl 1-eicosanollösning (punkt 4.12) per 5 g prov. För olivoljor av pressrester tillsätts 1 500 µl både av α-kolestanollösning (punkt 4.10) och av 1-eicosanol (punkt 4.12). Indunsta till torrhet under en svag ström av kväve i ett varmt vattenbad. Kyl kolven. Väg upp 5,00 ± 0,01 g torrt filtrerat prov i samma kolv.

Anmärkning 1: Animaliska eller vegetabiliska oljor och fetter som innehåller betydande kvantiteter av kolesterol kan visa en topp med en retentionstid som är identiskt med den för kolestanol. Om detta inträffar måste sterolfraktionen analyseras dubbelt med och utan intern standard.

Tillsätt 50 ml 2 M kaliumhydroxid i etanollösning (punkt 4.2) och lite pimpsten. Sätt på återloppskylaren och värm till svag kokning tills förtvålning inträder (lösningen blir klar). Fortsätt upphettningen under ytterligare 20 minuter och tillsätt sedan 50 ml destillerat vatten från toppen av återloppskylaren. Ta bort kylaren och kyl kolven till ca 30 °C.

Överför kolvens innehåll kvantitativt till en 500 ml separertratt (punkt 3.2) genom att använda flera portioner destillerat vatten (50 ml). Tillsätt ca 80 ml etyleter (punkt 4.6). Skaka omsorgsfullt i ungefär 60 sekunder och frigör regelbundet trycket genom att vända upp och ned på separertratten och öppna avstängningsventilen. Låt stå tills de två faserna har separerats fullständigt (Anmärkning 2). Överför därefter tvållösningen så fullständigt som möjligt i en annan separertratt. Genomför ytterligare två extraheringar av vatten-alkoholfasen på samma sätt med användande av 60–70 ml etyleter (punkt 4.6).

Anmärkning 2: Eventuell emulsion kan förstöras genom tillsats av små kvantiteter etanol (punkt 4.7).

Samla de tre eterextrakten i en separertratt som innehåller 50 ml vatten. Fortsätt att tvätta med vatten (50 ml) till dess att tvättvattnet inte längre ger en rosa färg vid tillsättning av en droppe fenolftaleinlösning (punkt 4.11). När tvättvattnet har avlägsnats, filtrera på vattenfritt natriumsulfat (punkt 4.4) ner i en i förväg vägd 250 ml kolv. Tvätta därefter tratten och filtret med små mängder etyleter (punkt 4.6).

Låt lösningsmedlet avdunsta genom destillation i en rotationsindunstare vid 30 °C under vakuum. Tillsätt 5 ml aceton (punkt 4.5) och avlägsna allt flyktigt lösningsmedel i en svag ström av kväve. Torka återstoden i torkskåp vid 103 ± 2 °C i 15 minuter. Kyl i exsickator och väg med 0,1 mg noggrannhet.

DEL 2

SEPARATION AV FRAKTIONER AV ALKOHOLFÖRENINGAR

1. TILLÄMPNINGSOMRÅDE

De oförtvålbara ämnen som bereds enligt del 1 fraktioneras i olika alkoholföreningar: alifatiska alkoholer, steroler och triterpendialkoholer (erytrodiol och uvaol).

2. PRINCIP

De oförtvålbara ämnena kan fraktioneras med basiska plattor för tunnskiktskromatografi (referensmetod). De identifieras och motsvarande band skrapas av och extraheras. En alternativ metod för separation är vätskekromatografi (HPLC) med kiselgelkolonn och UV-detektor, varvid de olika fraktionerna samlas upp. Alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer respektive sterol- och triterpendialkoholer isoleras tillsammans.

3. UTRUSTNING

Sedvanlig laboratorieutrustning, i synnerhet följande:

3.1 Komplett apparatur för tunnskiktskromatografi med 20 × 20 cm glasplattor.

3.2 UV-lampa med en våglängd på 366 eller 254 nm.

3.3 Mikrosprutor, 100 µl och 500 µl.

3.4 En cylindrisk filtrertratt med poröst membran G 3 (porositet 15–40 µm), med en diameter på ca 2 cm och ett djup på 5 cm, som passar för vakuumfiltrering, med hanslipning.

3.5 E-kolv med honslipning, 50 ml, som kan användas för filtrertratten (punkt 3.4).

3.6 Provrör med konisk botten och glaspropp, 10 ml.

3.7 Exsickator med kalciumklorid.

3.8 HPLC-system bestående av följande:

3.8.1 Binär pump.

3.8.2 Manuell eller automatisk injektor försedd med en 200 µL injektionsslinga.

3.8.3 In-line-avgasare.

3.8.4 UV-VIS eller IR-detektor.

3.9 HPLC-kolonn (25 cm x 4 mm innerdiameter) med kiselgel 60 (partikelstorlek 5 µm).

3.10 Sprutfilter, 0,45 µm.

3.11 E-kolv, 25 ml.

4. REAGENSER

4.1 Kaliumhydroxid, minst 85 %.

4.2 Kaliumhydroxid i etanollösning, ca 2 M.

Lös 130 g kaliumhydroxid (punkt 4.1) under kylning i 200 ml destillerat vatten och späd sedan till 1 liter med etanol (punkt 4.9). Förvara lösningen i väl tillslutna, mörka flaskor som lagras i högst två dagar.

4.3 Etyleter, av analyskvalitet.

4.4 Kaliumhydroxid i etanollösning, ca 0,2 M.

Lös 13 g kaliumhydroxid (punkt 4.1) i 20 ml destillerat vatten och späd till 1 liter med etanol (punkt 4.9).

4.5 Glasplattor (20x20) täckta med kiselgel utan fluorescensindikator, tjocklek 0,25 mm (finns i handeln färdiga för användning).

4.6 Aceton, av kromatografisk kvalitet.

4.7 n-hexan, av kromatografisk kvalitet.

4.8 Etyleter, av kromatografisk kvalitet.

4.9 Etanol, av analyskvalitet.

4.10 Etylacetat, av analyskvalitet.

4.11 Referenslösning för tunnskiktskromatografi: kolesterol, fytosteroler, alkoholer och erytrodiol 5 % lösning i etylacetat (punkt 4.10).

4.12 Lösning av 2,7-diklorflourecein, 0,2 %, i etanollösning. Denna görs lätt basisk genom tillsättning av ett par droppar 2 M alkoholisk kaliumhydroxidlösning (punkt 4.2).

4.13 n-hexan (punkt 4.7)/etyleter (punkt 4.8): blandning 65:35 (V/V).

4.14 Mobil fas för HPLC, n-hexan (punkt 4.7)/etyleter (punkt 4.8) (1:1) (V/V).

5. REFERENSMETOD: SEPARATION AV ALKOHOLFÖRENINGAR GENOM BASISKA PLATTOR FÖR TUNNSKIKTSKROMATOGRAFI

Beredning av de basiska plattorna för tunnskiktskromatografi. Sänk ner eller doppa kiselgelplattorna (punkt 4.5) ca 4 cm i 0,2 M kaliumhydroxidetanollösning (punkt 4.4) i 10 sekunder och låt sedan torka i dragskåp i två timmar varefter de placeras i ett torkskåp vid 100 °C i en timme.

Ta ut plattorna från torkskåpet och förvara dem i en exsickator med kalciumklorid (punkt 3.7) tills de ska användas (plattor som behandlas på detta sätt måste användas inom 15 dagar).

Fyll på n-hexan/etyleterblandningen (punkt 4.13) (Anmärkning 3) i framkallningskammaren till ett djup av ca 1 cm. Stäng kammaren med tillhörande lock och låt stå svalt i minst en halvtimme så att jämvikten vätska/gas inställer sig. Remsor av filtrerpapper som doppas ner i eluenten kan placeras på insidorna av kammaren. Detta minskar framkallningstiden med ca en tredjedel och leder till en jämnare eluering av komponenterna.

Anmärkning 3: Framkallningsblandningen ska bytas för varje prov för att få exakt reproducerbara elueringsförhållanden. En blandning av 50:50 (V/V) av n-hexan/etyleter kan också användas.

Förbered en ca 5 % lösning av de oförtvålbara ämnen som beretts enligt del 1 i etylacetat (punkt 4.10) och stryk med 100 µl mikrosprutan (punkt 3.3) ut 0,3 ml av lösningen smalt och jämnt på den nedre delen (2 cm) av kromatografiplattan (punkt 4.5). Placera i linje med strykningen 2 till 3 µl av referenslösningen (punkt 4.11) så att sterol-, triterpendialkohol- och alkoholbanden kan identifieras efter framkallning.

Placera plattan i framkallningskammaren (punkt 3.1). Rumstemperaturen ska hållas mellan 15 och 20 °C (Anmärkning 4). Stäng kammaren omedelbart med locket och påbörja elueringen tills lösningsmedlets främre kant når till ca 1 cm från övre änden av plattan. Ta ut plattan ur framkallningskammaren och låt lösningsmedlet avdunsta i en ström av varmluft eller genom att plattan får ligga en kort stund i dragskåp.

Anmärkning 4: Högre temperatur kan försämra separationen.

Spraya plattan lätt och jämnt med 2,7-diklorfloureceinlösningen (punkt 4.12) och låt torka. När plattan betraktas i ultraviolett ljus (punkt 3.2) kan sterol-, triterpendialkohol- och alkoholbanden identifieras genom att de ligger i höjd med fläckarna som erhållits från referenslösningen (punkt 4.11). Markera änden av banden längs kanterna av fluorescensen med svart blyerts (se TLC-platta, figur 1).

Skrapa med hjälp av en metallspatel bort kiselgelen från det markerade området. Placera det finfördelade materialet som tagits bort i filtrertratten (punkt 3.4). Tillsätt 10 ml het etylacetat (punkt 4.10), blanda omsorgsfullt med metallspateln och filtrera (vid behov under vakuum) i E-kolven (punkt 3.5) som är ansluten till filtrertratten.

Tvätta återstoden i kolven tre gånger med etyleter (punkt 4.3) (ca 10 ml varje gång) och samla upp filtratet i samma kolv som är ansluten till filtrertratten. Indunsta filtratet till en volym på 4–5 ml och överför resterande lösning till det tidigare vägda 10 ml provröret (punkt 3.6). Låt indunsta till torrhet under lätt uppvärmning, i svagt kväveflöde, fyll på nytt genom att använda några droppar aceton (punkt 4.6) och indunsta åter till torrhet. Återstoden i provröret består av sterol- och triterpendialkoholfraktionerna eller av alkohol- och triterpenalkoholfraktionerna.

6. SEPARATION AV ALKOHOLFRAKTIONER GENOM VÄTSKEKROMATOGRAFI (HPLC)

Lös upp de oförtvålbara ämnen som erhålls enligt del 1 i 3 ml av den mobila fasen (4.14), filtrera lösningen med ett sprutfilter (punkt 3.10) och ställ åt sidan.

Spruta in en lösning 200 µL av de oförtvålbara ämnena i HPLC-systemet (punkt 3.8).

Genomför HPLC-separationen med 0,8 ml/min. Häll bort under de första fem min. Därefter samlas i 25 ml e-kolvar (punkt 3.11) alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer mellan den femte och tionde minuten samt steroler, erytrodiol och uvaol mellan den elfte och 25:e minuten (Anmärkning 5).

Separationen kan övervakas med en UV-detektor på våglängden 210 nm eller med en refraktionsindexdetektor (se figur 6).

Fraktionerna får indunsta till torrhet och förbereds för kromatografanalys.

Anmärkning 5: Kontrollera noggrant HPLC-pumpens tryck. Etyleter kan öka trycket. Justera flödet för att hålla trycket under kontroll.

DEL 3

GASKROMATOGRAFISK ANALYS AV FRAKTIONER AV ALKOHOLFÖRENINGAR

1. TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Denna del ger allmänna riktlinjer för tillämpning av kapillärgaskromatografi för att bestämma den kvalitativa och kvantitativa sammansättning av de alkoholföreningar som isoleras enligt den metod som beskrivs i del 2.

2. PRINCIP

De fraktioner som samlas från de oförtvålbara ämnena med hjälp av tunnskiktskromatografi (TLC) eller vätske-kromatografi (HPLC) derivatiseras till trimetylsilyletrar och analyseras med kapillärgaskromatografi med splitinjektion och flamjoniseringsdetektor.

3. UTRUSTNING

Sedvanlig laboratorieutrustning, i synnerhet följande:

3.1 Provrör med konisk botten och glaspropp, 10 ml.

3.2 Gaskromatograf lämpad för användning med kapillärkolonn med splitinjektion, bestående av följande:

3.2.1 Termostatstyrd kolonnugn som kan hålla den önskade temperaturen med en noggrannhet av ± 1 °C.

3.2.2 Injektor med inställbar temperatur och försedd med ett förångningselement av glas med silaniserad yta och splitsystem.

3.2.3 Flamjoniseringsdetektor.

3.2.4 System för datainsamling lämpligt för användning tillsammans med flamjoniseringsdetektorn (punkt 3.10.3), som kan ställas in på manuell integration.

3.3 Kapillärkolonn med kiseldioxid med en längd på 20–30 meter, innerdiameter 0,25–0,32 mm, belagd med 5 % difenyl - 95 % dimetylpolysiloxan (SE-52 eller SE-54, stationär fas eller motsvarande), med en enhetlig filmtjocklek mellan 0,10 och 0,30 µm.

3.4 Mikrospruta på 10 µl, för gaskromatografi, med härdad nål lämplig för splitinjektion.

4. REAGENSER

4.1 Vattenfri pyridin, av kromatografisk kvalitet.

4.2 Hexametyldisilasan, av analyskvalitet.

4.3 Trimetylklorosilan, av analyskvalitet.

4.4 Provlösningar av steroltrimetylsilyletrar. Bereds omedelbart före användning av steroler och erytrodiol som erhållits från oljor som innehåller dem.

4.5 Standardlösningar av trimetylsilyletrar av alifatiska alkoholer från C20 till C28. De kan framställas av blandningar av rena alkoholer omedelbart innan de ska användas.

4.6 Bärgas: vätgas eller helium, ren, för gaskromatografi.

4.7 Hjälpgaser: väte, helium, kväve och luft, av gaskromatografisk kvalitet.

4.8 Silyleringsreagens, bestående av en blandning 9:3:1 (V/V/V) av pyridin/hexametyldisilasan/trimetylklorosilan.

4.9 n-hexan, av kromatografisk kvalitet.

5. BEREDNING AV TRIMETYLSILYLETRAR

Tillsätt silyleringsreagensen (punkt 4.8) (Anmärkning 6), i förhållandet 50 µl för varje mg alkoholförening, i provröret (punkt 3.1) som innehåller alkoholföreningsfraktionen. Undvik upptag av fuktighet (Anmärkning 7).

Anmärkning 6: Lösningar som är klara för användning finns i handeln. Andra silyleringsreagenser, t.ex. bistrimetylsilyltrifluoracetamid + 1 % trimetylklorosilan, som måste spädas med lika stor volym vattenfri pyridin finns också i handeln. Pyridin kan ersättas med samma mängd acetonitril.

Anmärkning 7: Eventuell bildning av en svag opalescens är normal och inverkar inte. Bildandet av en vit flockning eller rosafärgning är tecken på förekomst av fukt eller sönderfall hos reagensen. Om detta inträffar måste testet upprepas (endast om hexametyldisilazan/trimetylklorsilan används).

Sätt proppen i provröret (punkt 3.1), skaka försiktigt (utan att vända på det) tills föreningarna är helt lösta. Låt stå i minst 15 minuter i rumstemperatur och centrifugera sedan i ett par minuter. Den klara lösningen är nu färdig för analys med gaskromatografi.

6. GASKROMATOGRAFISK ANALYS

6.1 Förberedelser, iordningställande av kapillärkolonn

Montera kolonnen (punkt 3.3) i gaskromatografen genom att kolonnens inlopp ansluts till splitinjektorn och kolonnens utlopp till detektorn.

En allmän kontroll av gaskromatografen genomförs (gasanslutningarna ska vara täta, detektorn i fullgott skick, splitsystem och registreringssystem fungerande etc.).

Kapillärkolonner som används för första gången bör prepareras. En liten mängd gas får flyta genom kolonnen och sedan kopplas gaskromatografen på och en gradvis upphettning genomförs tills temperaturen är minst 20 °C över drifttemperaturen (Anmärkning 8). Denna temperatur bibehålls i minst två timmar och sedan ställs kromatografen iordning för driftförhållanden (inställning av gasflöde och splittning, tändning av flamman, anslutning till databehandlingssystemet, inställning av temperaturen i kolonnen, detektorn och injektorn etc.), och signalen registreras med en känslighet som är minst två gånger högre än den som beräknas för analysen. Baslinjen ska vara linjär, utan några toppar av något slag, och får inte visa tecken på drift. Negativ drift av linjen är tecken på otäta kolonnanslutningar, medan en positiv drift tyder på otillräcklig preparering av kolonnen.

Anmärkning 8: Temperaturen vid prepareringen ska alltid vara minst 20 °C lägre än den maximitemperatur som specificeras för den stationära fas som används.

6.2 Driftsförhållanden

Optimera temperaturprogrammet och bärgasflödet på så sätt att kromatogram som liknar figurerna 3–6 erhålls.

Följande parametrar har provats och befunnits vara användbara:

6.2.1 Alifatiska alkoholer

Program för torkskåp	180 °C (8 min.) → 260 °C (5 °C/min.) → 260 °C (15 min.)
Injektortemperatur	280 °C
Detektortemperatur	290 °C
Bärgasens linjära hastighet	helium (20–30 cm/s), väte (30–50 cm/s)
Splitförhållande	1:50 till 1:100
Injektionsvolym	0,5 till 1 µl av TMSE-lösning

6.2.2 Sterol- och triterpendialkoholer

Program för torkskåp	260 ± 5 °C (isotermisk)
Injektortemperatur	280–300 °C
Detektortemperatur	280–300 °C
Bärgasens linjära hastighet	helium (20–30 cm/s) väte (30–50 cm/s)
Splitförhållande	1:50 till 1:100
Injektionsvolym	0,5 till 1 µl av TMSE-lösning

Dessa parametrar kan ändras beroende på egenskaperna hos kolonnen och gaskromatografen för att få kromatogram som uppfyller följande krav:

— Alkoholretentionstiden C26 ska vara 18 ± 5 minuter.

— Toppen för alkoholen C22 ska vara 80 ± 20 % av hela skalvärdet för olivolja och 40 ± 20 % av hela skalvärdet för olivolja av pressrester.

— Retentionstiden för ß-sitosteroltoppen bör vara 20 ± 5 minuter.

— Kampesteroltoppen bör vara följande: för olivolja (medelhalt 3 %) 20 ± 5 % av fullt utslag.

— Alla närvarande steroler måste separeras. Förutom att separeras måste alla toppar vara helt och hållet synliga, dvs. varje toppkurva ska återvända till baslinjen innan nästa topp ritas. Ofullständig upplösning kan emellertid tolereras under förutsättning att toppen vid RRT 1,02 (sitostanol) kan kvantifieras med hjälp av topphöjden.

6.3 Analysförfarande

Sug med hjälp av en 10 µl mikrospruta (punkt 3.4) upp 1 µl hexan, sug in 0,5 µl luft och sedan 0,5–1 µl av provlösningen. Dra ut kolven ur sprutan ytterligare så att kanylen töms. Stick in kanylen genom membranet i injektorn och spruta snabbt efter en till två sekunder in innehållet och drag sedan sakta ut kanylen efter ca fem sekunder. En automatisk injektor kan även användas.

Genomför registreringen tills de närvarande motsvarande alkoholföreningarnas TMSE har eluerats fullständigt. Baslinjen måste fortfarande uppfylla kraven för motsvarande driftsförhållanden (punkt 6.2.1 eller 6.2.2).

6.4 Identifiering av toppar

Identifiera individuella toppar på grundval av retentionstiderna och genom jämförelse med blandningen av alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer eller sterol- och triterpendialkohol-TMSE, som analyseras med samma parametrar. Ett kromatogram för de alifatiska alkoholernas och triterpenalkoholernas fraktion visas i figur 3 och motsvarande kromatogram för steroler och triterpendialkoholer visas i figur 2.

De alifatiska alkoholerna elueras i följande ordning: C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol och C28-ol.

Sterolerna och triterpendialkoholerna elueras i följande ordning: kolesterol, brassikasterol, ergosterol, 24-metylenkolesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ7-kampesterol, Δ5,23-stigmastadienol, klerosterol, ß-sistosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7-stigmastenol, Δ7-avenasterol, erytrodiol och uvaol.

6.5 Kvantitativ utvärdering

Toppområdena för 1-eicosanol och de alifatiska alkoholerna C22, C24, C26 och C28 beräknas genom ett system för datainsamling. Responsen för 1-eicosanol ska vara lika med 1.

Beräkna areorna för α-kolestanol- och sterol- och triterpendialkoholtopparna med hjälp av databehandlingssystemet. Bortse från toppar för föreningar som inte finns med (ergosterol ska inte beräknas) bland de som är upptagna i tabell 1. Responsen för α-kolestanol ska vara lika med 1.

Beräkna koncentrationen för varje enskild alkoholförening i mg/kg fett enligt följande:

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

där

A_x = topparean för alkoholföreningen x, enligt beräkning av databehandlingssystemet,

A_s = arean av toppen för 1-eicosanol/α-kolestanol, enligt beräkning av databehandlingssystemet,

m_s = massan av tillsatt 1-eicosanol/α-kolestanol i milligram,

m = massan av det prov som använts för bestämningen, i gram.

7. RESULTATANGIVELSE

Ange de enskilda alifatiska alkoholernas och triterpenalkoholernas koncentration i mg/kg fett och summan av dem som 'totalhalten alifatiska alkoholer'. Totalhalten är summan av C22, C24, C26 och C28.

Varje enskild alkoholförenings sammansättning bör anges med en decimals noggrannhet.

Sterolkoncentrationen bör anges utan decimal.

Beräkna procentandelen av varje enskild sterol som förhållandet mellan den aktuella topparean och den totala topparean för steroler:

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

där

A_x = topparean för sterol x,

ΣA = total topparea för steroler.

Apparent β-sitosterol: Δ5,23-stigmastadienol + klerosterol + β-sitosterol + sitostanol + Δ5-avenasterol + Δ5,24-stigmastadienol.

Beräkna procentandelen erytrodiol och uvaol:

$$Erytrodiol + \ uvaol = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

där

A_{Er} = arean för erytrodiol enligt beräkning av databehandlingssystemet,

A_{Uv} = arean för uvaol enligt beräkning av databehandlingssystemet,

ΣA_T = summan av arean för sterol + erytrodiol + uvaol enligt beräkning av databehandlingssystemet.

Utöver beräkningen av procentandelen enskilda steroler och triterpendialkoholer och den totala sterolkoncentrationen ska även koncentrationen av erytrodiol och av uvaol och deras summor, i mg/kg fett, beräknas enligt följande:

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

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

där

A_{Er} = toppområde för erytrodiol, enligt beräkning av databehandlingssystemet,

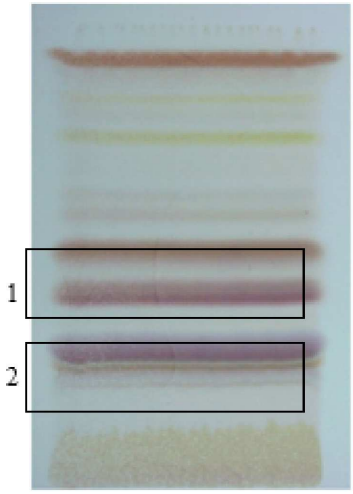
A_{Uv} = arean för uvaol enligt beräkning av databehandlingssystemet,

A_s = arean av toppen för α-kolestanol, enligt beräkning av databehandlingssystemet,

m_s = massan av tillsatt α-kolestanol i milligram,

m = massan av det prov som använts för bestämningen, i gram.

Tillägg



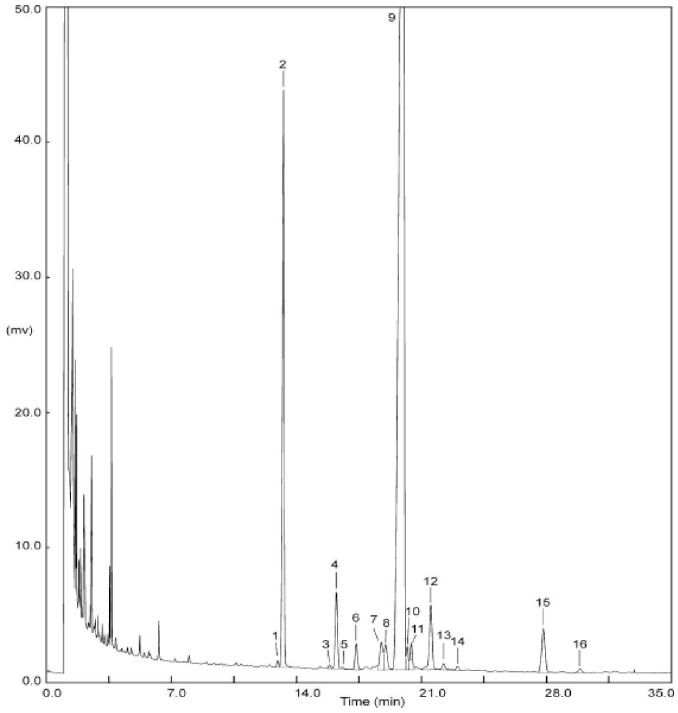
1. Kolväten
2. α-tokoferol
3. Prenoler
4. Triterpenalkoholer
5. Alifatiska alkoholer
6. Metylsteroler
7. Steroler
8. Triterpendialkoholer

Figur 1 – TLC av den oförtvålbara fraktionen från olivolja av pressrester, eluerad två gånger med hexan:dietyleter (65:35), framkallad med SO4H2 (50 %) och upphettad. De band som ska skrapas av visas i rektanglarna. Rektangel 1 är banden för alifatiska alkoholer och rektangel 2 banden för steroler och triterpendialkoholer.

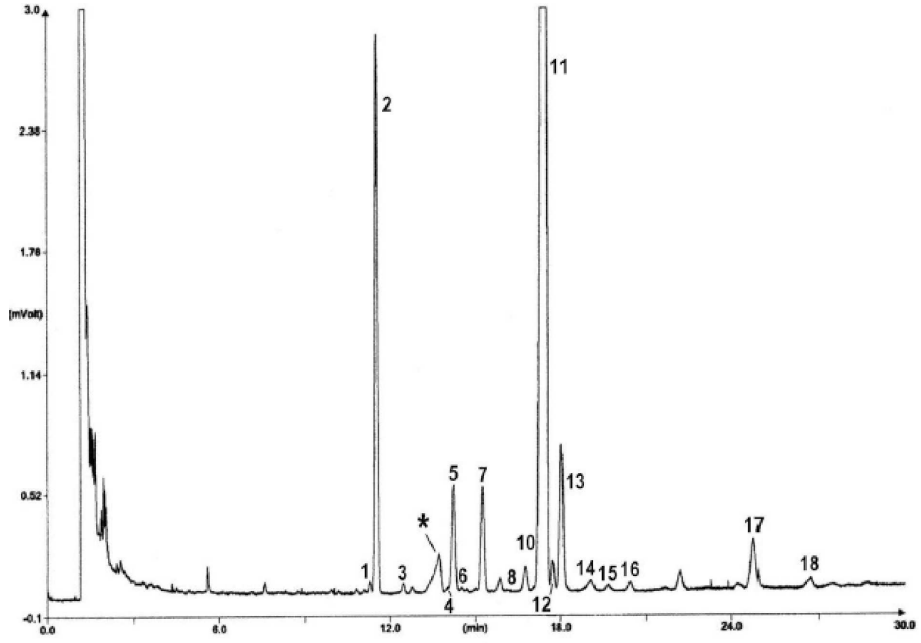
Tabell I – Relativa retentionstiden för steroler

Topp	Identifiering		Relativ retentionstid	
			SE 54-kolonn	SE 52-kolonn
1	Kolesterol	Δ-5-kolesten-3ß-ol	0,67	0,63
2	Kolestanol	5α-kolestan-3ß-ol	0,68	0,64
3	Brassikasterol	[24S]-24-metyl-Δ-5,22-kolestadien-3β-ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-metyl-Δ-5,7,22 kolestatrien-3β-ol	0,78	0,76
4	24-metylenkolesterol	24-metylen-Δ-5,24-kolestadien-3ß-o1	0,82	0,80
5	Kampesterol	[24R]-24-metyl-Δ-5-kolesten-3ß-ol	0,83	0,81
6	Kampestanol	[24R]-24-metylkolestan-3ß-ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	[24S]-24-etyl-Δ-5,22-kolestadien-3ß-ol	0,88	0,87
8	Δ-7-kampesterol	[24R]-24-metyl-Δ-7-kolesten-3ß-ol	0,93	0,92
9	Δ-5,23-stigmastadienol	[24R,S]-24-etyl-Δ-5,23-koIestadien-3ß-ol	0,95	0,95
10	Klerosterol	[24S]-24-etyl-Δ-5,25-kolestadien-3ß-ol	0,96	0,96

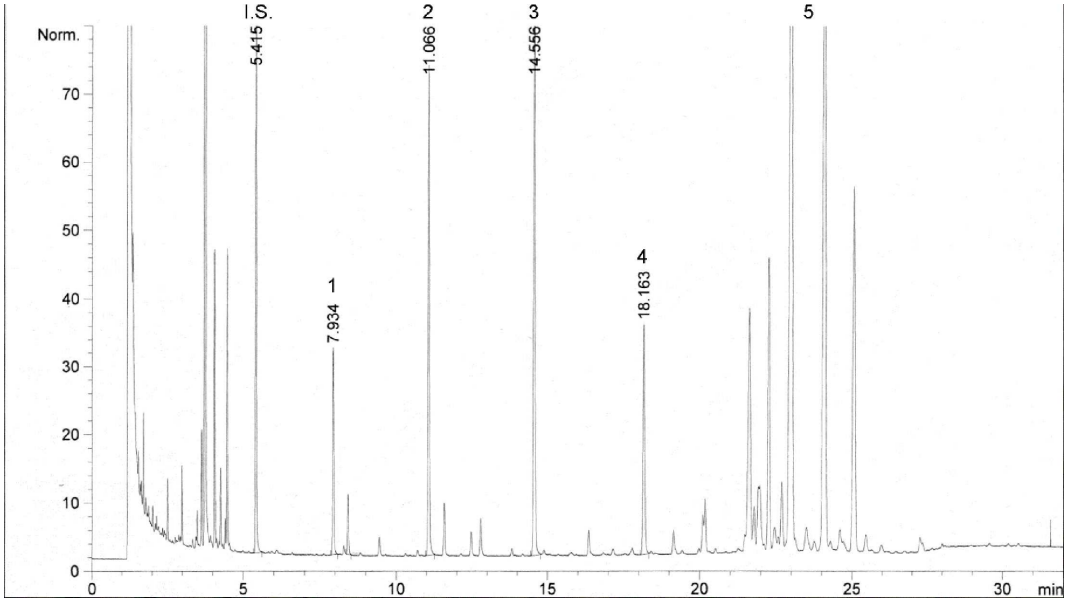
Topp	Identifiering		Relativ retentionstid	
			SE 54-kolonn	SE 52-kolonn
11	ß-sitosterol	[24R]-24-etyl-Δ-5-kolesten-3ß-ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etyl-kolestan-3ß-ol	1,02	1,02
13	Δ-5-avenasterol	[24Z]-24-etyliden-Δ-kolesten-3ß-ol	1,03	1,03
14	Δ-5,24-stigmastadienol	[24R,S]-24-etyl-Δ-5,24-kolestadien-3ß-ol	1,08	1,08
15	Δ-7-stigmastenol	[24R,S]-24-etyl-Δ-7-kolesten-3ß-ol	1,12	1,12
16	Δ-7-avenasterol	[24Z]-24-etyliden-Δ-7-kolesten-3ß-ol	1,16	1,16
17	Erytrodiol	5α-olean-12-en-3β,28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ12-ursen-3β,28-diol	1,52	1,52



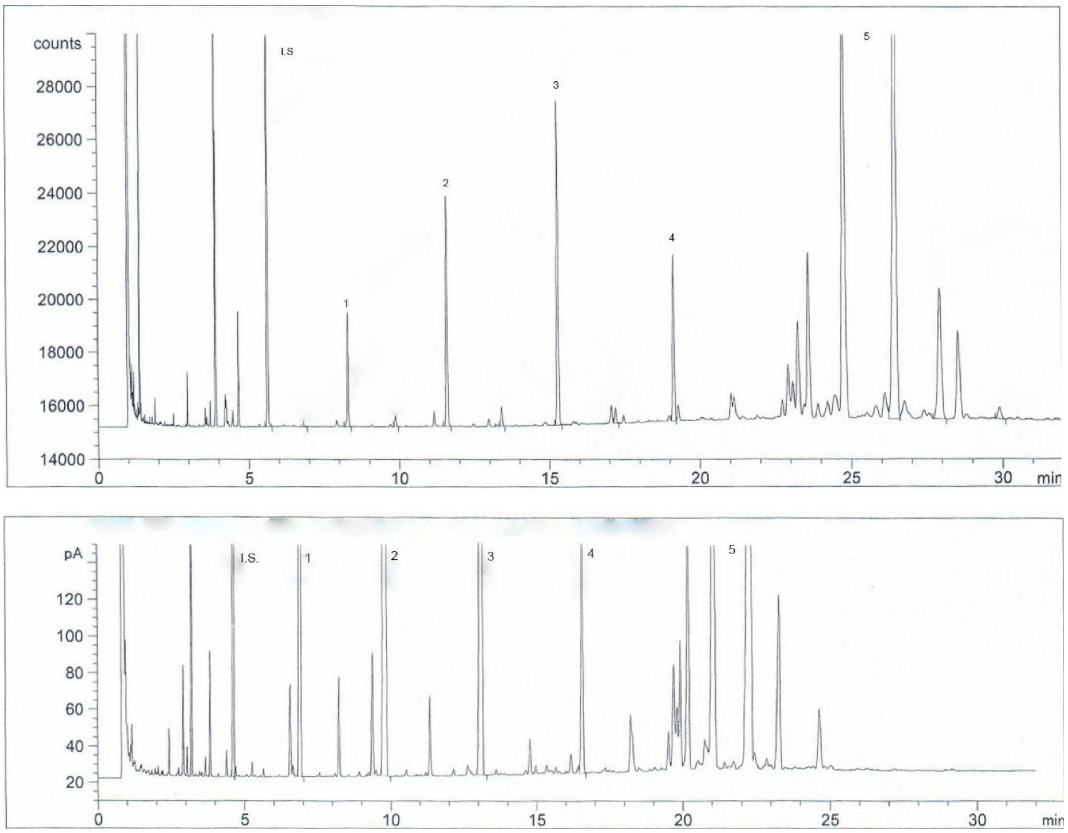
Figur 2 – Kromatografisk profil (GC-FID) för sterol- och triterpendialkoholer från raffinerad olivolja. (1) kolesterol, (2) α-kolestanol (I.S.), (3) 24-metylenkolesterol, (4) kampesterol, (5) kampestanol, (6) stigmasterol, (7) Δ5,23-stigmastadienol, (8) klerosterol, (9) β-sitosterol, (10) sitostanol, (11) Δ5-avenasterol, (12) Δ5,24-stigmastadienol, (13) Δ7-stigmastenol, (14) Δ7-avenasterol, (15) erytrodiol, (16) uvaol.



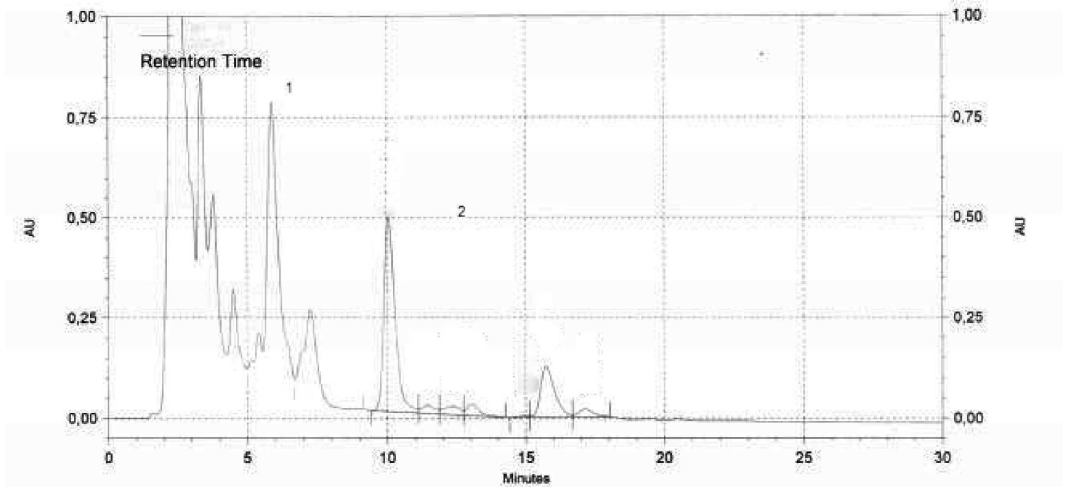
Figur 3 – Kromatografisk profil (GC-FID) för sterol- och triterpendialkoholer från bomolja. (1) kolesterol, (2) α-kolestanol, (3) brassikasterol, (4) 24-metylenkolesterol, (5) kampesterol, (6) kampestanol, (7) stigmasterol, (8) Δ7-kampesterol, (9) Δ5,23-stigmastadienol, (10) klerosterol, (11) β-sitosterol, (12) sitostanol, (13) Δ5-avenasterol, (14) Δ5,24-stigmastadienol, (15) Δ7-stigmastenol, (16) Δ7-avenasterol, (17) erytrodiol, (18) uvaol.



Figur 4 – Kromatografisk profil (GC-FID) för alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer från olivolja. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) triterpenalkoholer.



Figur 5 – Kromatografisk profil (GC-FID) för alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer från raffinerad olivolja och en andra centrifugering av olivolja. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) triterpenalkoholer.



Figur 6 – HPLC-kromatogram för en olivolja, oförtvålbara ämnen separerade genom HPLC med hjälp av en UV-detektor. (1) Alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer. (2) Steroler och triterpendialkoholer.”