

DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) Nr. 1348/2013 DER KOMMISSION**vom 16. Dezember 2013****zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 über die Merkmale von Olivenölen und Oliventresterölen sowie die Verfahren zu ihrer Bestimmung**

DIE EUROPÄISCHE KOMMISSION —

gestützt auf den Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union,

gestützt auf die Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 vom 22. Oktober 2007 über eine gemeinsame Organisation der Agrarmärkte und mit Sondervorschriften für bestimmte landwirtschaftliche Erzeugnisse (Verordnung über die einheitliche GMO) ⁽¹⁾, insbesondere auf Artikel 113 Absatz 1 Buchstabe a sowie Artikel 121 Absatz 1 Buchstaben a und h, in Verbindung mit Artikel 4,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) In der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 der Kommission ⁽²⁾ sind die chemischen und organoleptischen Eigenschaften von Olivenöl und Oliventresteröl sowie Verfahren zur Beurteilung dieser Eigenschaften festgelegt. Diese Verfahren sowie die Grenzwerte für die Merkmale von Olivenölen sollten unter Berücksichtigung des Gutachtens der Chemie-Sachverständigen und im Einklang mit den Arbeiten im Rahmen des Internationalen Olivenölrats („IOR“) aktualisiert werden.
- (2) Um die Umsetzung der jüngsten vom IOR aufgestellten internationalen Normen auf EU-Ebene zu gewährleisten, sollten bestimmte Analyseverfahren sowie bestimmte Grenzwerte für die Eigenschaften von Ölen, die in der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 festgelegt sind, aktualisiert werden.
- (3) Folglich sollten die Grenzwerte für Stigmastadiene, Wachse, Myristinsäure und Fettsäurealkylester angepasst und einige schematisierte Entscheidungsabläufe für die Prüfung der Konformität einer Olivenölprobe mit der deklarierten Kategorie entsprechend geändert werden. Schematisierte Entscheidungsabläufe für Campesterin und Delta-7-Stigmasterin sowie strengere Parameter sollten eingeführt werden, um im Interesse des Verbraucherschutzes den Handel zu erleichtern und die Echtheit des Olivenöls zu gewährleisten. Das Verfahren zur Analyse der Zusammensetzung und des Gehalts an Sterinen sowie zur Bestimmung des Gehalts an Erythrodiol und Uvaol sollte durch ein zuverlässigeres Verfahren ersetzt werden, das auch Triterpen-Dialkohole erfasst. Ebenfalls angebracht sind eine Überprüfung der organoleptischen Prüfung von Olivenöl sowie die Aufnahme eines Verfahrens, das die Feststellung pflanzlicher Fremddöle in Olivenölen ermöglicht.
- (4) In Anbetracht der Entwicklungen im Zusammenhang mit den Verfahren für die Konformitätsprüfungen von Ölen sollte das Verfahren der Probenahme von Olivenöl und Oliventresterölen entsprechend angepasst werden.
- (5) Die Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 sollte daher entsprechend geändert werden.
- (6) Im Interesse des reibungslosen Übergangs zur neuen Regelung und bis alle für die Anwendung der Regelung erforderlichen Mittel bereitstehen, sollten, auch um den Handel nicht zu beeinträchtigen, die mit dieser Verordnung vorgenommenen Änderungen erst ab dem 1. März 2014 gelten. Aus denselben Gründen ist vorzusehen, dass Olivenöle und Oliventresteröle, die vor dem genannten Zeitpunkt rechtmäßig in der Gemeinschaft hergestellt und etikettiert oder rechtmäßig in die Gemeinschaft eingeführt und in den freien Verkehr übergeführt werden, in Verkehr gebracht werden dürfen, bis die Lagerbestände verbraucht sind.
- (7) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Verwaltungsausschusses für die gemeinsame Organisation der Agrarmärkte —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Die Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 wird wie folgt geändert:

(1) Artikel 2 erhält folgende Fassung:

„Artikel 2

1. Die Merkmale der Öle gemäß Anhang I dieser Verordnung werden nach folgenden Analyseverfahren bestimmt:

- a) freie Fettsäuren, berechnet in Prozent Ölsäure, nach dem Verfahren des Anhangs II;
- b) Peroxidzahl nach dem Verfahren des Anhangs III;
- c) Wachsgehalt nach dem Verfahren des Anhangs IV;
- d) Zusammensetzung und Gehalt an Sterinen und Triterpen-Dialkoholen durch Kapillar-Gaschromatographie nach dem Verfahren des Anhangs V;
- e) prozentualer Anteil an 2-Glycerinmonopalmitat nach dem Verfahren des Anhangs VII;
- f) spektrophotometrische Analyse nach dem Verfahren des Anhangs IX;
- g) Fettsäurezusammensetzung nach dem Verfahren der Anhänge XA und XB;
- h) flüchtige halogenierte Lösungsmittel nach dem Verfahren des Anhangs XI;

⁽¹⁾ ABl. L 299 vom 16.11.2007, S. 1.

⁽²⁾ Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 der Kommission vom 11. Juli 1991 über die Merkmale von Olivenölen und Oliventresterölen sowie die Verfahren zu ihrer Bestimmung (ABl. L 248 vom 5.9.1991, S. 1).

- i) Bestimmung der organoleptischen Merkmale nativer Olivenöle nach dem Verfahren des Anhangs XII;
- j) Stigmasterinnachweis nach dem Verfahren des Anhangs XVII;
- k) Bestimmung der Zusammensetzung der Triglyceride mit ECN42 nach dem Verfahren des Anhangs XVIII;
- l) Gehalt an aliphatischen Alkoholen nach dem Verfahren des Anhangs XIX;
- m) Gehalt an Wachsen, Fettsäuremethylestern und Fettsäurethylestern nach dem Verfahren des Anhangs XX.

Zum Nachweis von pflanzlichen Fremddölen in Olivenölen wird das Analyseverfahren des Anhangs XXa angewendet.

2. Die Prüfung der organoleptischen Merkmale nativer Olivenöle durch die einzelstaatlichen Behörden oder ihre Vertreter wird von durch die Mitgliedstaaten zugelassenen Prüfergruppen vorgenommen.

Die organoleptischen Merkmale eines in Unterabsatz 1 genannten Olivenöls werden als mit der deklarierten Olivenölkategorie übereinstimmend angesehen, wenn eine von dem betreffenden Mitgliedstaat zugelassene Prüfergruppe die diesbezügliche Einstufung bestätigt.

Bestätigt die zugelassene Prüfergruppe die organoleptischen Merkmale der deklarierten Olivenölkategorie nicht, so fordern die einzelstaatlichen Behörden oder ihre Vertreter auf Antrag des Betroffenen zwei Gegenanalysen anderer zugelassener Prüfergruppen an, von denen mindestens eine von einer Prüfergruppe vorgenommen wird, die von dem betreffenden Erzeugermitgliedstaat zugelassen wurde. Die fraglichen Merkmale gelten als mit den deklarierten Merkmalen konform, wenn zwei Gegenanalysen die deklarierte Einstufung bestätigen. Im gegenteiligen Fall sind – unbeschadet der fälligen Sanktionen – die Kosten für die Gegenanalysen vom Betroffenen zu tragen.

3. Bei der Überprüfung der Merkmale der in Absatz 1 genannten Öle durch die nationalen Behörden oder ihre Vertreter erfolgen die Probenahmen gemäß den internationalen Normen EN ISO 661 betreffend die Vorbereitung der Untersuchungsproben und EN ISO 5555 betreffend die Entnahme der Proben. Jedoch werden die Proben bei Partien, die aus Olivenöl in unmittelbaren Umschließungen bestehen, abweichend von Nummer 6.8 der Norm EN ISO 5555 gemäß den Bestimmungen von Anhang Ia dieser Verordnung entnommen. Bei unverpackten Ölen, bei denen die Probenahme nicht gemäß der Norm EN ISO 5555 durchgeführt werden kann, wird die Probe entsprechend den Anweisungen der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats entnommen.

Unbeschadet der Bestimmungen der Norm EN ISO 5555 und des Kapitels 6 der Norm EN ISO 661 werden die

Proben unverzüglich vor Licht und starker Hitze geschützt sowie spätestens am fünften Arbeitstag nach der Probenahme zur Analyse in das Laboratorium geschickt; ansonsten werden die Proben so aufbewahrt, dass sie während des Transports oder während der Lagerung vor dem Versand an das Laboratorium nicht verderben oder beschädigt werden.

4. Bei der Überprüfung gemäß Absatz 3 erfolgen die Analysen bei verpackten Erzeugnissen gemäß den Anhängen II, III, IX, XII und XX sowie gegebenenfalls die in den einzelstaatlichen Rechtsvorschriften vorgesehenen Gegenanalysen vor Erreichen des Mindesthaltbarkeitsdatums. Bei unverpackten Ölen müssen die Proben spätestens im sechsten Monat nach der Probenahme analysiert werden.

Für die übrigen in dieser Verordnung vorgesehenen Analysen gelten keine Fristen.

Entsprechen die Analyseergebnisse nicht den Merkmalen der angemeldeten Kategorie Olivenöl bzw. Oliventrestestöl, so wird der Beteiligte davon spätestens einen Monat vor Ablauf der in Unterabsatz 1 genannten Frist in Kenntnis gesetzt, es sei denn, die Probenahme ist weniger als zwei Monate vor dem Mindesthaltbarkeitsdatum erfolgt.

5. Bei der nach einem der Verfahren in Absatz 1 Unterabsatz 1 vorgenommenen Bestimmung der Merkmale der Öle werden die Analyseergebnisse direkt mit den in dieser Verordnung vorgesehenen Grenzwerten verglichen.“

- (2) Anhang I erhält die Fassung von Anhang I der vorliegenden Verordnung.
- (3) Anhang Ia erhält die Fassung von Anhang II der vorliegenden Verordnung.
- (4) Anhang Ib erhält die Fassung von Anhang III der vorliegenden Verordnung.
- (5) Anhang V erhält die Fassung von Anhang IV der vorliegenden Verordnung.
- (6) Anhang VI wird gestrichen.
- (7) Anhang XII erhält die Fassung von Anhang V der vorliegenden Verordnung.
- (8) Anhang XXa, dessen Wortlaut in Anhang VI dieser Verordnung angegeben ist, wird nach Anhang XX eingefügt.

Artikel 2

Erzeugnisse, die vor dem 1. März 2014 rechtmäßig in der Gemeinschaft hergestellt und etikettiert oder rechtmäßig in die Gemeinschaft eingeführt und in den freien Verkehr übergeführt werden, dürfen in Verkehr gebracht werden, bis die Lagerbestände verbraucht sind.

Artikel 3

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

Sie gilt ab dem 1. März 2014.

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

Brüssel, den 16. Dezember 2013

Für die Kommission
Der Präsident
José Manuel BARROSO

ANHANG I

„ANHANG 1

MERKMALE VON OLIVENÖLEN

Kategorie	Fettsäureethylester (FAEE) mg/kg (*)	Säuregehalt (%) (*)	Peroxid-zahl meq O ₂ /kg (*)	Wachse mg/kg (**)	2 Glycerin-monopalmitat (%)	Stigmastadien mg/kg (¹)	ECN42- Differenz zwischen HPLC-Messwert und theoretischer Berechnung (²)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ oder K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Sensorische Prüfung Fehlermedian (Md) (*)	Sensorische Prüfung Fruchtigkeitsmedian (Mf) (*)
1. Natives Olivenöl extra	FAEEs ≤ 40 (Erntejahr 2013-2014) (³) FAEEs ≤ 35 (Erntejahr 2014-2015) FAEEs ≤ 30 (Erntejahre nach 2015)	≤ 0,8	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 wenn Gesamtgehalt an Palmitin-säure ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 wenn Gesamtgehalt an Palmitin-säure > 14 %							
2. Natives Olivenöl	—	≤ 2,0	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 wenn Gesamtgehalt an Palmitin-säure ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 wenn Gesamtgehalt an Palmitin-säure > 14 %							
3. Lampantöl	—	> 2,0	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 300 (⁴)	≤ 0,9 wenn Gesamtgehalt an Palmitin-säure ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (⁵)	—
					≤ 1,1 wenn Gesamtgehalt an Palmitin-säure > 14 %							
4. Raffiniertes Olivenöl	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 wenn Gesamtgehalt an Palmitin-säure ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 wenn Gesamtgehalt an Palmitin-säure > 14 %							

Kategorie	Fettsäureethylester (FAEE) mg/kg (*)	Säuregehalt (%) (*)	Peroxid-zahl meq O ₂ /kg (*)	Wachse mg/kg (**)	2 Glycerin-monopalmitat (%)	Stigmastadien mg/kg (1)	ECN42- Differenz zwischen HPLC-Messwert und theoretischer Berechnung (2)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ oder K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Sensorische Prüfung Fehlermedian (Md) (*)	Sensorische Prüfung Fruchtigkeitsmedian (Mf) (*)
5. Olivenöl bestehend aus raffinierten und nativen Olivenölen	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 wenn Gesamtgehalt an Palmitin-säure ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0 wenn Gesamtgehalt an Palmitin-säure > 14 %							
6. Rohes Oliventresteröl	—	—	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350 (6)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Raffiniertes Oliventresteröl	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Oliven-tresteröl	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Summe der mittels Kapillarsäule (nicht) abtrennbaren Isomere.

(2) Das Olivenöl muss dem Verfahren des Anhangs XXa entsprechen.

(3) Dieser Grenzwert gilt für ab dem 1. März 2014 erzeugte Olivenöle.

(4) Öl mit einem Wachsegehalt zwischen 300 mg/kg und 350 mg/kg wird als Lampantöl eingestuft, wenn der Gesamtgehalt an aliphatischen Alkoholen höchstens 350 mg/kg oder der Gehalt an Erythrodiol und Uvaol höchstens 3,5 % beträgt.

(5) Oder wenn der Fehlermedian größer als 3,5 ist oder der Fehlermedian höchstens 3,5 beträgt und der Fruchtigkeitsmedian gleich 0 ist.

(6) Öl mit einem Wachsegehalt zwischen 300 mg/kg und 350 mg/kg wird als rohes Oliventresteröl eingestuft, wenn der Gesamtgehalt an aliphatischen Alkoholen höchstens 350 mg/kg oder der Gehalt an Erythrodiol und Uvaol über 3,5 % beträgt.

Kategorie	Zusammensetzung der Fettsäuren (1)						Summe trans-isomere Öl-säure (%)	Summe trans-isomere Linol und Linolen-säure (%)	Zusammensetzung der Sterine						Sterine insges. (mg/kg)	Erythrodiol und Uvaol (%) (**)
	Myristin-säure (%)	Linolen-säure (%)	Arach-ninsäure (%)	Eicosen-säure (%)	Behen-säure (%)	Ligno-cerinsäure (%)			Choleste-rin (%)	Brassi-casterin (%)	Campe-sterin (2) (%)	Stigmaste-rin (%)	App. β-Sitoste-rin (%) (3)	Delta-7-Stigmaste-nol (2) (%)		
1. Natives Olivenöl extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Natives Olivenöl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Lampant-öl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (4)
4. Raffinier-tes Olivenöl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5

Kategorie	Zusammensetzung der Fettsäuren ⁽¹⁾						Summe trans-isomere Öl-säure (%)	Summe trans-isomere Linol und Linolen-säure (%)	Zusammensetzung der Sterine						Sterine insges. (mg/kg)	Erythrodiol und Uvaol (%) ^(**)
	Myristin-säure (%)	Linolen-säure (%)	Arach-ninsäure (%)	Eicosen-säure (%)	Behen-säure (%)	Ligno-cerinsäure (%)			Choleste-rin (%)	Brassi-casterin (%)	Campes-terin ⁽²⁾ (%)	Stigmaste-rin (%)	App. β-Sitoste-rin (%) ⁽³⁾	Delta-7-Stigmaste-nol ⁽²⁾ (%)		
5. Olivenöl – bestehend aus raf-finierten und nativen Olivenölen	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Rohes Oliven-tresteröl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁵⁾
7. Raffinier-tes Oliven-tresteröl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Oliven-tresteröl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Gehalt an anderen Fettsäuren (%): Palmitinsäure: 7,50-20,00; Palmitoleinsäure: 0,30-3,50; Heptadecansäure: ≤ 0,30; Heptadecensäure: ≤ 0,30; Stearinsäure: 0,50-5,00; Ölsäure: 55,00-83,00; Linolsäure: 3,50-21,00.

⁽²⁾ Siehe die Anlage zu diesem Anhang.

⁽³⁾ App β-Sitosterin: Delta-5,23-Stigmastadienol+Clerosterin+Beta-Sitosterin+Sitostanol+Delta-5-Avenasterin+Delta-5,24-Stigmastadienol.

⁽⁴⁾ Öl mit einem Wachsgehalt zwischen 300 mg/kg und 350 mg/kg wird als Lampantöl eingestuft, wenn der Gesamtgehalt an aliphatischen Alkoholen höchstens 350 mg/kg oder der Gehalt an Erythrodiol und Uvaol höchstens 3,5 % beträgt.

⁽⁵⁾ Öl mit einem Wachsgehalt zwischen 300 mg/kg und 350 mg/kg wird als rohes Oliventresteröl eingestuft, wenn der Gesamtgehalt an aliphatischen Alkoholen über 350 mg/kg oder der Gehalt an Erythrodiol und Uvaol über 3,5 % beträgt.

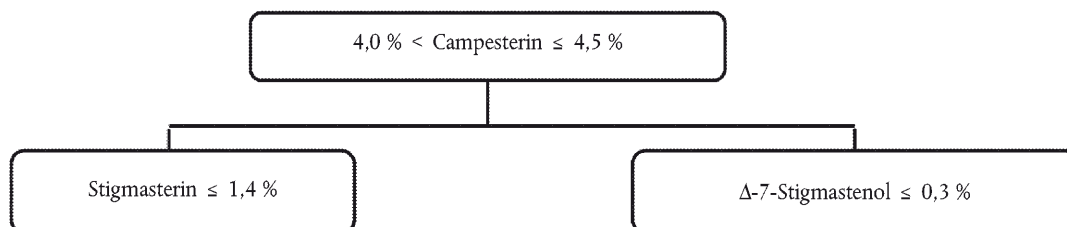
Anmerkungen:

- Die Analyseergebnisse müssen bis auf die gleiche Anzahl Dezimalstellen angegeben werden wie die für jedes Merkmal vorgesehenen Werte. Beträgt die nächstfolgende Dezimalstelle über 4, so ist die angegebene letzte Stelle hinter dem Komma aufzurunden.
- Auch wenn nur ein einziges Merkmal nicht mit dem vorgesehenen Grenzwert übereinstimmt, muss das Öl einer anderen Kategorie zugeordnet werden oder als nicht seinen Reinheitskriterien entsprechend erklärt werden.
- Die mit einem Sternchen (*) gekennzeichneten Ölqualitätsmerkmale bedeuten: - im Falle von Lampantöl, dass die betreffenden Grenzwerte nicht alle gleichzeitig erfüllt werden müssen; - im Falle nativer Olivenöle, dass die Nichterfüllung des Grenzwerts auch nur eines einzigen Merkmals eine Umstufung innerhalb der Kategorie der nativen Olivenöle zur Folge hat.
- Die mit zwei Sternchen (**) gekennzeichneten Ölqualitätsmerkmale bedeuten im Fall der betreffenden Oliventresteröle, dass die jeweiligen Grenzwerte nicht alle gleichzeitig erfüllt werden müssen.

Anlage

Schematisierter entscheidungsablauf

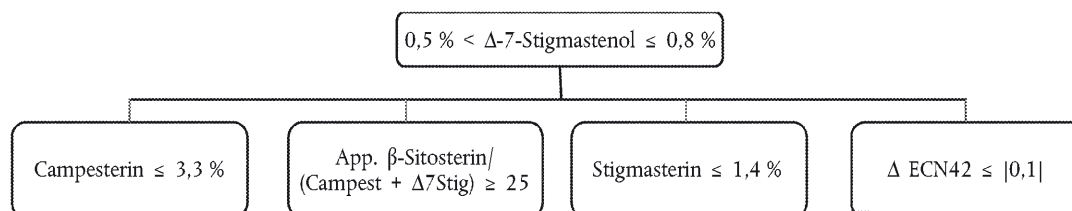
Entscheidungsablauf **Campesterin** für native Olivenöle und native Olivenöle extra:



Die übrigen Parameter müssen die in dieser Verordnung festgelegten Grenzwerte einhalten.

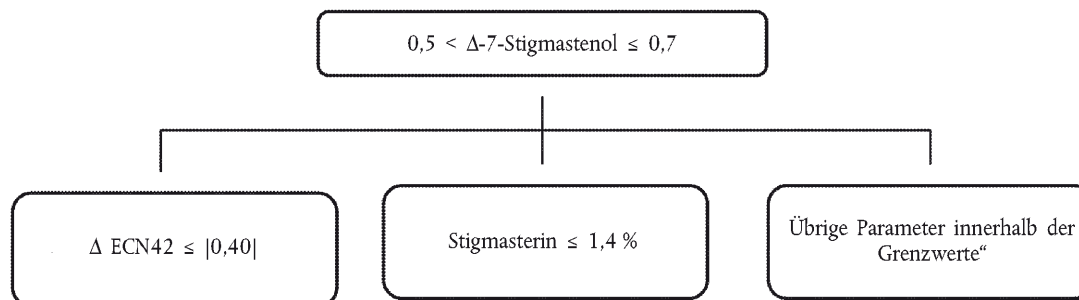
Entscheidungsablauf **Delta-7-stigmasterin** für:

— Native Olivenöle extra und native Olivenöle



Die übrigen Parameter müssen die in dieser Verordnung festgelegten Grenzwerte einhalten.

— Oliventresteröle (roh und raffiniert)



ANHANG II

„ANHANG Ia

PROBENAHME BEI OLIVENÖL ODER OLIVENTRESTERÖL, DAS IN UNMITTELBAREN VERPACKUNGSEINHEITEN GELIEFERT WIRD

Diese Methode der Probenahme wird für Partien von Olivenöl oder Oliventresteröl angewendet, das in unmittelbare Verpackungseinheiten abgefüllt wurde. Je nachdem, ob der Inhalt der unmittelbaren Verpackung größer ist als 5 l oder nicht, kommen unterschiedliche Probenahmeverfahren zur Anwendung.

Eine „Partie“ besteht aus mehreren Verkaufseinheiten, die unter solchen Umständen hergestellt und aufgemacht wurden, dass das in jeder dieser Einheiten enthaltene Öl in Bezug auf alle analytischen Eigenschaften als homogen gilt. Die Vereinzelung einer Partie muss gemäß der Richtlinie 2011/91/EU des Europäischen Parlaments und des Rates ⁽¹⁾ erfolgen.

„Teilprobe“ ist die Ölmenge, die in einer unmittelbaren Verpackungseinheit enthalten ist und von einer beliebigen Stelle der Partie entnommen wird.

1. ZUSAMMENSETZUNG EINER EINZELPROBE**1.1. Unmittelbare Verpackungseinheiten mit einem Inhalt von höchstens 5 l**

Eine „Einzelprobe“ für unmittelbare Verpackungseinheiten mit einem Inhalt von höchstens 5 l ist die Anzahl der einer Partie entnommenen Teilproben gemäß Tabelle 1.

Tabelle 1

Die Mindestgröße einer Einzelprobe muss sich wie folgt zusammensetzen

Verpackungseinheiten mit einem Inhalt von	Die Einzelprobe besteht aus dem Öl von
a) mindestens 1 l	a) 1 unmittelbaren Verpackungseinheit;
b) weniger als 1 l	b) der Mindestanzahl Verpackungseinheiten, deren Gesamtinhalt mindestens 1,0 l beträgt

Die Anzahl der in Tabelle 1 genannten Verpackungseinheiten, die eine Einzelprobe darstellen, kann von jedem Mitgliedstaat nach seinen eigenen Erfordernissen erhöht werden (beispielsweise Durchführung der organoleptischen Prüfung durch ein anderes Labor als das Labor, das die chemischen Analysen, Gegenanalysen usw. durchgeführt hat).

1.2. Unmittelbare Verpackungseinheiten mit einem Inhalt von mehr als 5 l

Eine „Einzelprobe“ für unmittelbare Verpackungseinheiten mit einem Inhalt von mehr als 5 l ist ein repräsentativer Teil der Gesamtteilproben, der durch ein Reduktionsverfahren gemäß Tabelle 2 gewonnen wird. Die Einzelprobe muss sich aus verschiedenen Mustern zusammensetzen.

Ein „Muster“ einer Einzelprobe ist jede der Verpackungseinheiten, aus denen die Einzelprobe besteht.

Tabelle 2

Mindestanzahl der auszuwählenden Teilproben

Anzahl der Verpackungseinheiten im Los	Mindestanzahl der auszuwählenden Teilproben
bis 10	1
von ... 11 bis 150	2
von ... 151 bis 500	3
von ... 501 bis 1 500	4
von ... 1 501 bis 2 500	5
> 2 500 je 1 000 Verpackungseinheiten	1 weitere Teilprobe

⁽¹⁾ Richtlinie 2011/91/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 13. Dezember 2011 über Angaben oder Marken, mit denen sich das Los, zu dem ein Lebensmittel gehört, feststellen lässt (ABl. L 334 vom 16.12.2011, S. 1).

Um den Umfang der unmittelbaren Verpackungseinheiten für die Probenahme zu reduzieren, wird der Inhalt der Probenahmeteilproben zur Herstellung der Einzelprobe homogenisiert. Die Portionen der verschiedenen Teilproben werden unter Rühren so in einen gemeinsamen Behälter zur Homogenisierung gegeben, dass sie am besten vor Luft geschützt sind.

Der Inhalt der Einzelprobe ist in mehrere Verpackungen der Mindestkapazität von 1,0 l zu geben, von denen jede ein Muster der Einzelprobe darstellt.

Die Anzahl der Einzelproben kann von jedem Mitgliedstaat nach seinen eigenen Erfordernissen erhöht werden (beispielsweise Durchführung der organoleptischen Prüfung durch ein anderes Labor als das Labor, das die chemischen Analysen, Gegenanalysen usw. durchgeführt hat).

Jede Verpackung ist so zu befüllen, dass oben eine möglichst geringe Luftschicht vorhanden ist, und danach auf geeignete Weise zu verschließen und zu versiegeln, so dass das Produkt manipulationssicher ist.

Diese Muster sind zu kennzeichnen, so dass eine korrekte Identifizierung ermöglicht wird.

2. ANALYSEN UND ERGEBNISSE

2.1. Jede Einzelprobe wird gemäß Nummer 2.5 der Norm EN ISO 5555 in Laborproben unterteilt, die entsprechend der im schematisierten Entscheidungsablauf des Anhangs Ib ausgewiesenen Reihenfolge oder in einer anderen beliebigen Reihenfolge analysiert werden.

2.2. Stimmen alle Analyseergebnisse mit den Merkmalen der gemeldeten Olivenölkategorie überein, so wird die gesamte Partie als konform eingestuft.

Stimmt ein einziges Analyseergebnis nicht mit den Merkmalen der gemeldeten Olivenölkategorie überein, so wird die gesamte Partie als nicht konform eingestuft.

3. ÜBERPRÜFUNG DER KATEGORIE DER PARTIE

3.1. Zur Überprüfung der Kategorie der Partie kann die zuständige Behörde die Anzahl der an verschiedenen Stellen der Partie entnommenen Einzelproben nach folgender Tabelle erhöhen:

Tabelle 3

Anzahl der Einzelproben in Abhängigkeit von der Partiegröße

Größe der Partie (l)	Anzahl der Einzelproben
weniger als 7 500	2
von 7 500 bis weniger als 25 000	3
von 25 000 bis weniger als 75 000	4
von 75 000 bis weniger als 125 000	5
ab 125 000	6 + 1 je weitere 50 000 l

Jede Teilprobe, die eine Einzelprobe darstellt, ist einer fortlaufenden Stelle in der Partie zu entnehmen; dabei ist der Ort jeder Einzelprobe zu notieren und eindeutig auszuweisen.

Jede Einzelprobe ist nach den Verfahren unter den Nummern 1.1 und 1.2 herzustellen.

Jede Einzelprobe wird anschließend den Analysen gemäß Artikel 2 Absatz 1 unterzogen.

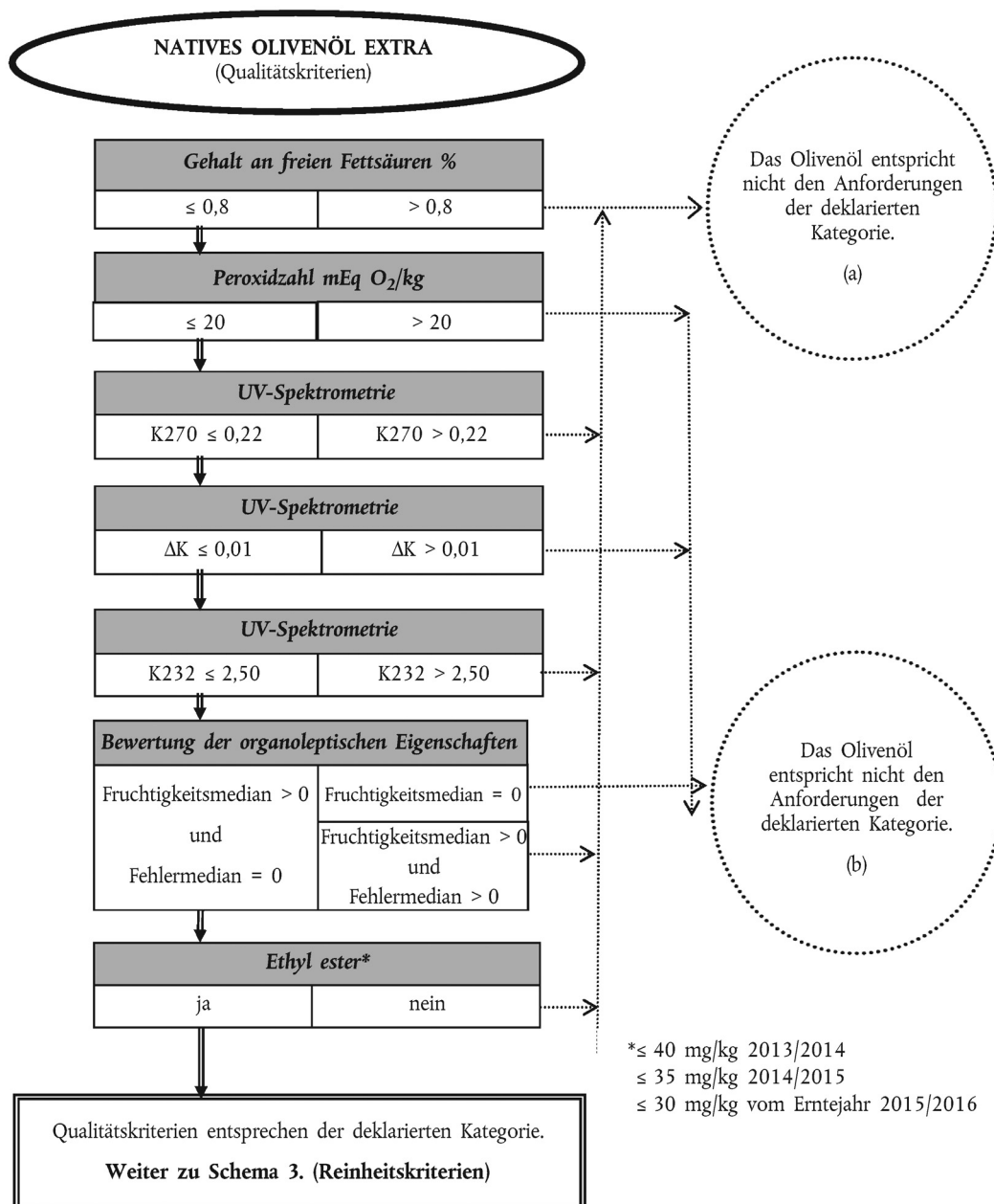
3.2. Stimmen für mindestens eine Einzelprobe nicht alle Analyseergebnisse gemäß Artikel 2 Absatz 1 mit den Merkmalen der gemeldeten Olivenölkategorie überein, so wird die gesamte Partie als nicht konform eingestuft.“

ANHANG III

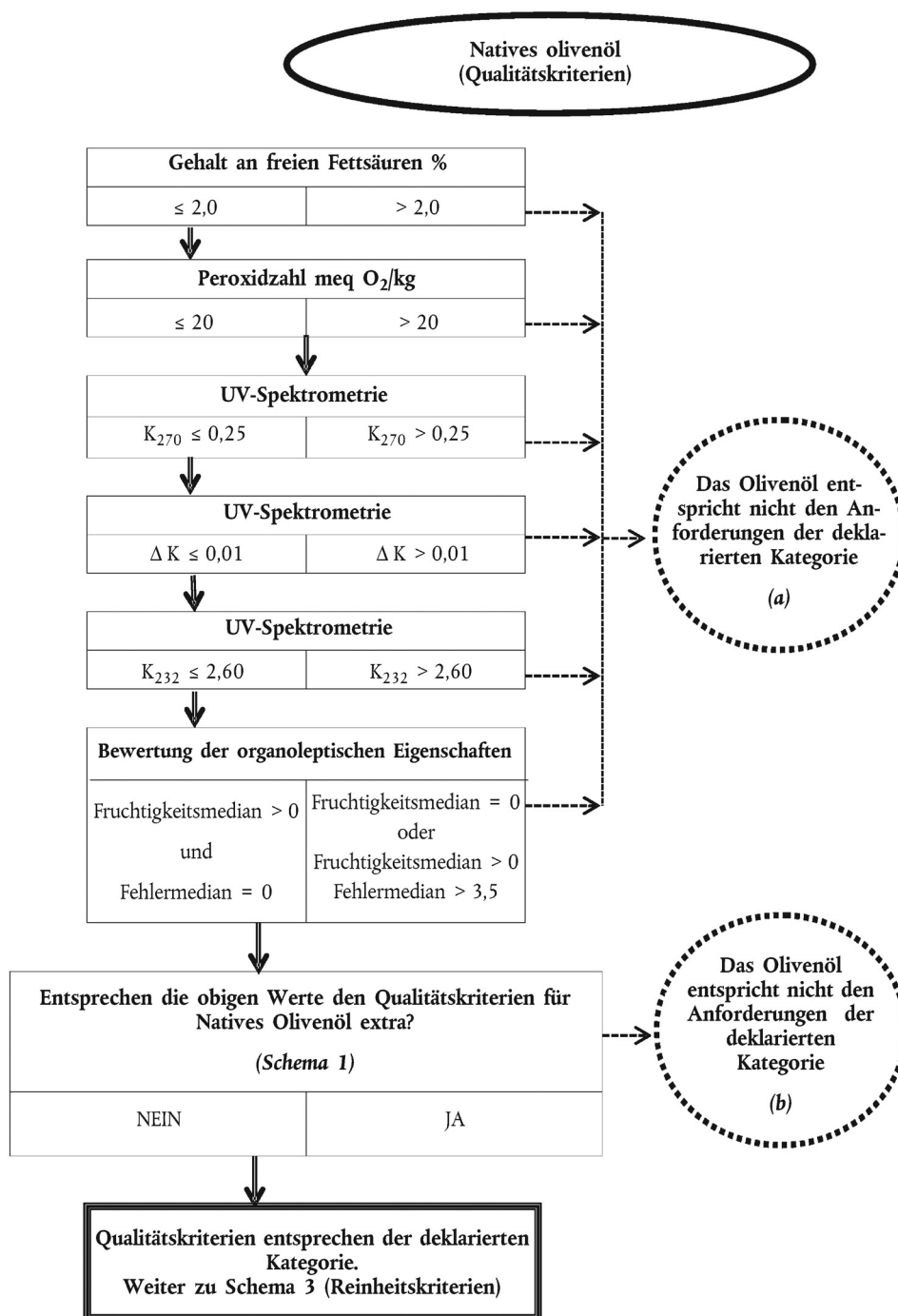
„ANHANG Ib

SCHEMATISIERTER ENTSCHEIDUNGSABLAUF FÜR DIE PRÜFUNG DER KONFORMITÄT EINER OLIVENÖLPROBE MIT DER DEKLARIERTEN KATEGORIE

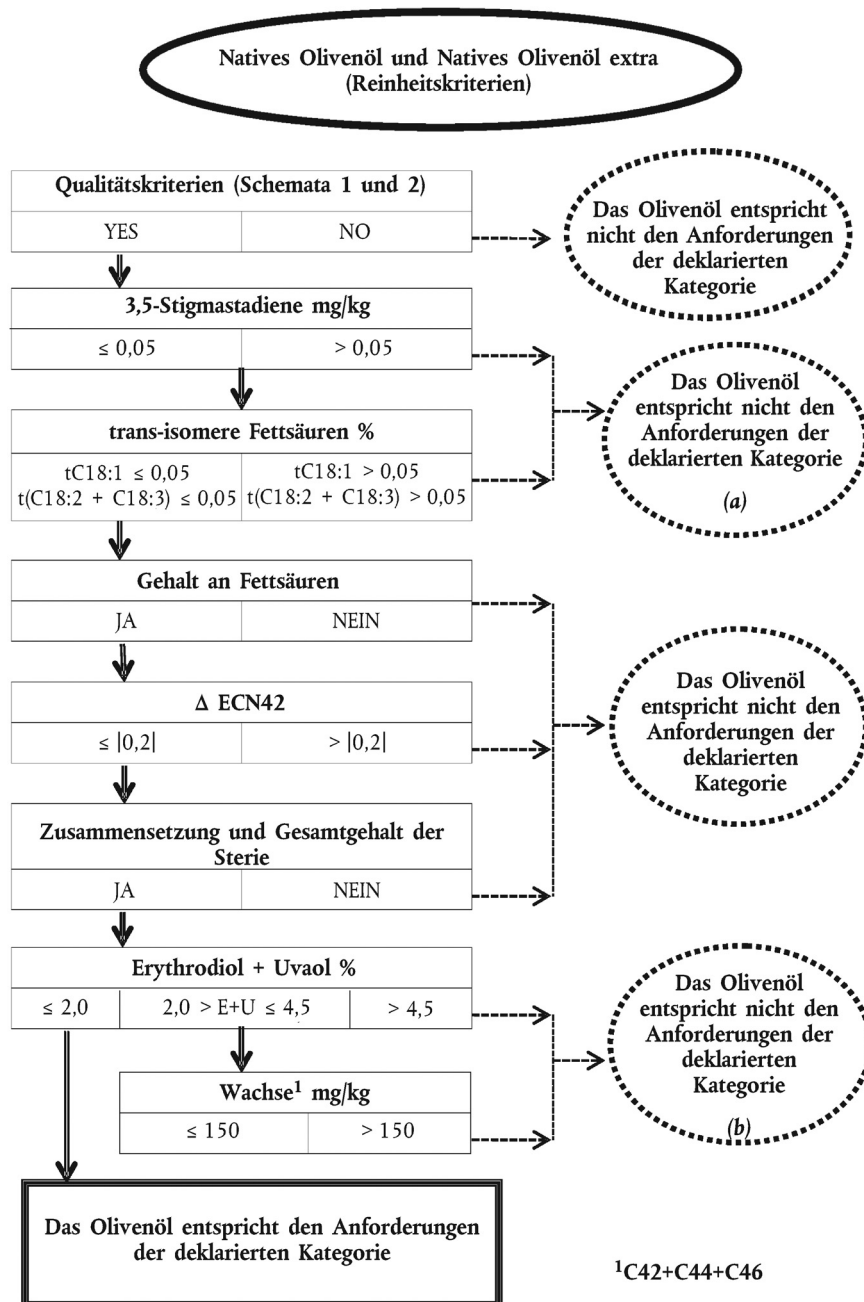
Schema 1



Schema 2



Schema 3



Anlage 1

Entsprechungen zwischen den Anhängen der vorliegenden Verordnung und den Analysen des Entscheidungsablaufs

— Säuregehalt	Anhang II	Bestimmung des Gehalts an freien Fettsäuren, Kaltverfahren
— Peroxidzahl	Anhang III	Bestimmung der Peroxidzahl
— UV-Spektrometrie	Anhang IX	Spektrophotometrische Analyse
— Bewertung der organoleptischen Eigenschaften	Anhang XII	Bewertung der organoleptischen Eigenschaften von nativem Olivenöl
— Ethylester	Anhang XX	Verfahren für die Bestimmung des Gehalts an Wachsen, Fettsäuremethylestern und Fettsäureethylestern durch Kapillargaschromatographie
— Stigmasta-3,5-dien	Anhang XVII	Methodik zur Bestimmung des Stigmastadiengehalts in pflanzlichen Ölen
— <i>trans</i> -isomere Fettsäuren	Anhang X A und	Gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester
	Anhang X B	Herstellung der Fettsäuremethylester
— Fettsäurezusammensetzung	Anhang X A und	Gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester
	Anhang X B	Herstellung der Fettsäuremethylester
— ΔECN42	Anhang XVIII	Bestimmung der Triglycerid-Zusammensetzung mit ECN42 (Differenz zwischen dem tatsächlichen und dem theoretischen Triglycerid-Gehalt)
— Zusammensetzung und Gesamtgehalt der Sterine — Erythrodiol und Uvaol	Anhang V	Bestimmung der Zusammensetzung und des Gehalts an Sterinen und Triterpen-Dialkoholen mit Kapillar- Gaschromatografie
— Wachse	Anhang IV	Bestimmung des Gehalts an Wachsen mit Kapillar-Gaschromatografie
— Aliphatische Alkohole	Anhang XIX	Bestimmung des Gehalts an aliphatischen Alkoholen mit Kapillar-Gaschromatografie
— Gesättigte Fettsäuren in 2-Stellung	Anhang VII	Bestimmung des prozentualen Gehalts an 2-Glycerinmonopalmitat“

ANHANG IV

„ANHANG V

BESTIMMUNG DER ZUSAMMENSETZUNG UND DES GEHALTS AN STERINEN UND TRITERPEN-DIALKOHOLEN MIT DER KAPILLAR - GASCHROMATOGRAPHIE**1. UMFANG UND ANWENDUNGSBEREICH**

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Sterinzusammensetzung und des Steringehalts sowie des Gehalts an Triterpen-Dialkoholen von Olivenölen und Oliventresterölen.

2. KURZBESCHREIBUNG

Das Öl wird mit α -Cholestanol als innerem Standard versetzt, mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung verseift und das Unverseifbare mit Ethylether extrahiert.

Die Sterin- und Triterpen-Dialkohol-Fraktion wird dünnschichtchromatographisch über basische Kieselgelplatten vom Unverseifbaren abgetrennt. Die aus dem Kieselgel isolierten Fraktionen werden in Trimethylsilylether überführt und anschließend mit Hilfe der Kapillar-Gaschromatographie untersucht.

3. GERÄTE UND HILFSMITTEL

Übliche Laboreinrichtung und insbesondere nachstehende Geräte:

- 3.1. Kolben, 250 ml, mit Rückflusskühler und Schliffstopfen,
 - 3.2. Scheidetrichter, 500 ml,
 - 3.3. Kolben, 250 ml,
 - 3.4. komplette Apparatur für die Dünnschichtchromatographie mit Glasplatten 20 × 20 cm,
 - 3.5. UV-Lampe, Wellenlänge 254 oder 366 nm,
 - 3.6. Mikroliterspritzen, 100 und 500 μ l,
 - 3.7. Glasfiliertiegel mit Porenfilter G 3 (Porosität 15-40 μ m), etwa 2 cm Durchmesser, 5 cm Höhe, geeignet für die Vakuumfiltration mit Schliffmuffe,
 - 3.8. Vakuumflasche, 50 ml, mit Schliffmuffe, für Glasfiliertiegel (Nummer 3.7),
 - 3.9. 10-ml-Röhrchen mit konischem Boden und dicht schließendem Glasstopfen,
 - 3.10. Gaschromatograph, geeignet für die Verwendung von Kapillarsäulen, mit Splitsystem, bestehend aus:
 - 3.10.1. einem thermostatisierbaren Säulenofen, einstellbar auf die gewünschte Temperatur mit einer Genauigkeit von ± 1 °C,
 - 3.10.2. einem temperaturregelbaren Injektor mit Verdampfer aus persilanisiertem Glas und Splitsystem,
 - 3.10.3. einem Flammenionisations-Detektor (FID),
 - 3.10.4. einem Datenerfassungssystem, geeignet zur Verwendung mit dem FID (Nummer 3.10.3), manuell integrierbar,
 - 3.11. Glaskapillarsäule oder Fused-silica-Säule, 20 bis 30 m Länge, 0,25 bis 0,32 mm Innendurchmesser, Innenwand belegt mit 5 % Diphenyl- / 95 % Dimethylpolysiloxan (SE-52 oder SE-54 stationäre Phase oder gleichwertig), gleichmäßige Schichtdicke zwischen 0,10 und 0,30 μ m,
 - 3.12. Mikroliterspritze für die Gaschromatographie, 10 μ l, mit gehärteter Nadel, geeignet für Split-Injektion,
 - 3.13. Calciumdichlorid-Exsikkator.
- 4. REAGENZIEN**
- 4.1. Kaliumhydroxid (Titer mindestens 85 %),

- 4.2. Kaliumhydroxid, ethanolische Lösung etwa 2 N:
130 g Kaliumhydroxid (Nummer 4.1) in 200 ml destilliertem Wasser unter Kühlen lösen und mit Ethanol auf 1 Liter auffüllen (Nummer 4.10). Die Lösung ist in gut verschlossenen Braunglasflaschen maximal zwei Tage haltbar,
- 4.3. Ethylether, analyserein,
- 4.4. Kaliumhydroxid, ethanolische Lösung etwa 0,2 N:
13 g Kaliumhydroxid (Nummer 4.1) werden in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und mit Ethanol auf 1 Liter aufgefüllt (Nummer 4.10),
- 4.5. wasserfreies Natriumsulfat, analyserein,
- 4.6. kieselgelbeschichtete Glasplatten (20 x 20 cm) ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0,25 mm (gebrauchsfertig im Handel erhältlich),
- 4.7. Toluol für die Chromatographie,
- 4.8. Aceton für die Chromatographie,
- 4.9. *n*-Hexan für die Chromatographie,
- 4.10. Ethylether für die Chromatographie,
- 4.11. Ethanol, analyserein,
- 4.12. Ethylacetat, analyserein,
- 4.13. Referenzlösung für die Dünnschichtchromatographie: Cholesterin oder Phytosterole, und Erythrodiol-Lösung 5 % in Ethylacetat (Nummer 4.11),
- 4.14. 2', 7'-Dichlorfluorescein, 0,2%ige ethanolische Lösung, leicht alkalisch durch Zusatz einiger Tropfen alkoholischer 2-N-Kaliumhydroxid- Lösung (Nummer 4.2),
- 4.15. wasserfreies Pyridin für die Chromatographie (Anmerkung 5).
- 4.16. Hexamethyldisilazan, analyserein,
- 4.17. Trimethylchlorosilan, analyserein,
- 4.18. Probelösung von Sterin-Trimethylsilylethern,
unmittelbar vor Gebrauch ansetzen mit Sterinen und Erythrodiol aus Ölen, in denen sie enthalten sind,
- 4.19. α -Cholestanol, Reinheit mehr als 99 % (Reinheit mit GC-Analyse überprüfen),
- 4.20. α -Cholestanol-Lösung, interner Standard, 0,2 %ige Lösung (m/V) in Ethylacetat (Nummer 4.11).
- 4.21. Phenolphthalein-Lösung, 10 g/l in Ethanol (Nummer 4.10).
- 4.22. Trägergas: Wasserstoff oder Helium, rein, für die Gaschromatographie,
- 4.23. Hilfsgase: Wasserstoff, Helium, Stickstoff und Luft, rein, für die Gaschromatographie,
- 4.24. *n*-Hexan (Nummer 4.9)/Ethylether (Nummer 4.10)-Gemisch 65:35 (V/V),
- 4.25. Silanisierungsreagens, bestehend aus einem Gemisch aus Pyridin, Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorosilan im Verhältnis 9:3:1 (V/V/V).
5. VERFAHREN
- 5.1. Herstellung des Unverseifbaren
- 5.1.1. Mit einer 500- μ l-Mikroliterspritze (Nummer 3.6) so viel der α -Cholestanollösung (interner Standard) (Nummer 4.20) in einen 250-ml-Kolben (Nummer 3.1) geben, dass die Menge an Cholestanol etwa 10 % des Steringehalts der Probe entspricht. So werden z. B. für 5 g Olivenöl 500 μ l der α -Cholestanollösung (Nummer 4.20) benötigt, für Oliventresteröl 1 500 μ l. Im leichten Stickstoffstrom im warmen Wasserbad bis zur Trocknung abdampfen. Nach dem Abkühlen des Kolbens in den gleichen Kolben $5 \pm 0,01$ g der trockenen und filtrierten Probe einwiegen.

Anmerkung 1: Bei tierischen oder pflanzlichen Ölen und Fetten, die größere Mengen an Cholesterin enthalten, kann ein Peak mit einer ähnlichen Retentionszeit wie Cholestanol auftreten. In diesem Fall ist die Sterinfraktion einmal mit und einmal ohne internen Standard zu analysieren.

- 5.1.2. Die Probe bei aufgesetztem Rückflusskühler mit 50 ml 2-N-ethanolischer Kaliumhydroxidlösung (Nummer 4.2) und Bims versetzen, erhitzen und unter schwachem Sieden verseifen (wobei sich die Lösung klärt). Die Probe weitere 20 Minuten am Sieden halten und dann durch den Rückflusskühler mit 50 ml destilliertem Wasser versetzen, den Rückflusskühler entfernen und den Kolben auf etwa 30 °C abkühlen.
- 5.1.3. Den Kolbeninhalt quantitativ in einen 500-ml-Scheidetrichter (Nummer 3.2) überführen, wobei mehrfach mit destilliertem Wasser (50 ml) nachgespült wird. Die Probe mit etwa 80 ml Ethylether (Nummer 4.10) versetzen, etwa 60 Sekunden kräftig schütteln und den Druck durch Umdrehen des Scheidetrichters und Öffnen des Sperrhahns periodisch entlasten. Stehen lassen, bis die beiden Phasen vollständig getrennt sind (Anmerkung 2).

Anschließend die Seifenlösung so vollständig wie möglich in einen anderen Scheidetrichter ablassen und dann die Wasser-Alkohol-Phase noch zweimal nach dem gleichen Verfahren mit 60-70 ml Ethylether extrahieren (Nummer 4.10).

Anmerkung 2: Etwaige Emulsionen können mit Hilfe einer Waschflasche durch Zusatz kleiner Mengen Ethanol zerstört werden (Nummer 4.11).

- 5.1.4. Die drei Etherauszüge in einem Scheidetrichter mit 50 ml Wasser vereinigen. Weiter mit Wasser (50 ml) unter Zusatz eines Tropfens Phenolphthalein-Lösung (Nummer 4.21) waschen, bis das Waschwasser nicht mehr rosa gefärbt ist.

Das Waschwasser ablassen und über wasserfreiem Natriumsulfat (Nummer 4.5) in einen zuvor gewogenen 250-ml-Kolben filtrieren. Scheidetrichter und Filter mit kleinen Mengen Ethylether nachspülen (Nummer 4.10).

- 5.1.5. Das Lösungsmittel durch Destillieren in einem Rotationsverdampfer bei 30 °C im Vakuum eindampfen. 5 ml Aceton hinzugeben und das flüchtige Lösungsmittel in einem leichten Luftzug vollständig entfernen. Den Rückstand bei 103 °C ± 2 °C im Trockenschrank 15 Minuten lang trocknen. Im Exsikkator abkühlen lassen und auf 0,1 mg genau wiegen.

- 5.2. Trennung der Sterin- und Triterpen-Dialkohol-Fraktion (Erythrodiol + Uvaol)

- 5.2.1. Herstellung der basischen Dünnschicht-Chromatographie-Platten Die Kieselgelplatten (Nummer 4.6) vollständig ca. 10 Sekunden lang in eine 0,2-N-ethanolische Alkalihydroxidlösung (Nummer 4.5) eintauchen, dann unter einem Abzug 2 Stunden trocknen lassen, anschließend noch 1 Stunde bei 100 °C im Trockenschrank.

Die Platten aus dem Trockenschrank nehmen und in einem Exsikkator über Calciumchlorid (Nummer 3.13) bis zum Gebrauch aufbewahren. (Derart behandelte Platten müssen innerhalb von 15 Tagen gebraucht werden.)

Anmerkung 3: Bei Verwendung von alkalischen Kieselgelplatten zur Trennung der Sterinfraktion erübrigt sich die Behandlung der Unverseifbaren-Fraktion mit Aluminiumoxid. Auf diese Weise bleiben sämtliche sauren Verbindungen (Fettsäuren und andere) an der Startlinie. So erhält man eine saubere Trennung der Sterinzone von denen der aliphatischen Alkohole und Terpenalkohole.

- 5.2.2. Die Entwicklerkammer bis zu einer Höhe von etwa 1 cm mit einem Hexan/Ethylether-Gemisch (Nummer 4.24) (Anmerkung 4) beschicken. Die Kammer mit einem geeigneten Deckel verschließen und mindestens eine halbe Stunde an einem kühlen Ort stehen lassen, damit sich ein Gleichgewicht zwischen Flüssigkeit und Dampfphase einstellt. An der Innenwand der Kammer können Filterpapierstreifen befestigt werden, die in das Fließmittel eintauchen. Dadurch kann die Laufzeit um ein Drittel verkürzt und eine gleichmäßige Elution der Komponenten erzielt werden.

Anmerkung 4: Das Gemisch ist jedes Mal frisch anzusetzen, damit die Wiederholbarkeit gewährleistet ist. Als alternatives Lösungsmittel kann n-Hexan/Ethylether 50:50 (V/V) verwandt werden.

- 5.2.3. Von einer 5%igen Lösung des Unverseifbaren (Nummer 5.1.5) in Ethylacetat mit einer 100-µl-Spritze 0,3 ml als dünnen, gleichmäßigen Strich 2 cm auf den unteren Rand (2 cm) der Dünnschichtplatte (Nummer 5.2.1) auftragen. In der Verlängerung der Startlinie werden 2-3 µl der Standardlösung (Nummer 4.13) aufgetragen, um die Sterin- und Triterpen-Dialkohol-Zone nach der Entwicklung zu identifizieren.

- 5.2.4. Die Platte in die nach Nummer 5.2.2 vorbereitete Entwicklerkammer stellen. Die Temperatur der Umgebung sollte 15-20 °C (Anmerkung 5) betragen. Die Kammer mit dem Deckel verschließen und die Platte so lange entwickeln, bis die Fließmittelfront bis 1 cm unter den oberen Plattenrand gestiegen ist. Dann die Platte aus der Entwicklerkammer nehmen und das Lösungsmittel in einem warmen Luftstrom abdampfen oder die Platte eine geraume Zeit unter dem Abzug liegen lassen.

Anmerkung 5: Eine höhere Temperatur könnte die Separation verschlechtern.

- 5.2.5. Die Platte vorsichtig und gleichmäßig mit 2',7'-Dichlorfluoresceinlösung (Nummer 4.14) besprühen. Unter UV-Licht die Lage der Sterin- und Triterpen-Dialkohol-Zone mit Hilfe der Flecke der Standardlösung (Nummer 4.13) bestimmen und mit einem schwarzen Stift den fluoreszierenden Bereich markieren (siehe Dünnschichtplatte Abbildung 3).

- 5.2.6. Das in der markierten Zone liegende Kieselgel mit einem Metallspatel abkratzen, fein mahlen und in einen Glasfiliertiegel (Nummer 3.7) überführen. Mit 10 ml warmem Ethylacetat (Nummer 4.12) versetzen, mit Hilfe des Metallspatels gründlich vermischen und unter Vakuum filtrieren. Das Filtrat in der an dem Glasfiliertiegel angeschlossenen Vakuumflasche (Nummer 3.8) auffangen.

Den Rückstand in der Flasche dreimal mit je 10 ml Ethylether (Nummer 4.3) waschen und das Filtrat wiederum in der Vakuumflasche auffangen. Das Filtrat bis auf ein Volumen von etwa 4-5 ml eindampfen und den Rest der Lösung in das zuvor gewogene 10-ml-Probenglas (Nummer 3.9) überführen. Durch vorsichtiges Erhitzen unter einem schwachen Stickstoffstrom bis zur Trocknung eindampfen. Mit einigen Tropfen Aceton (Nummer 4.8) versetzen, wieder bis zur Trocknung eindampfen.

Der Rückstand in dem Probengläschen muss aus den Sterin- und Triterpen-Dialkohol-Fractionen bestehen.

- 5.3. Herstellung der Trimethylsilylether (TMSE)

- 5.3.1. Dem Probengläschen mit der Sterin- und Terpenfraction werden je Milligramm Sterin und Triterpen-Dialkohole 50 µl Silanisierungsreagenz (Nummer 4.25) zugesetzt, unter Ausschluss von Feuchtigkeit (Anmerkung 7).

Anmerkung 6: Gebrauchsfertige Lösungen sind im Handel erhältlich. Daneben gibt es auch andere Silanisierungsreagenzien, z. B. N,O-bis-Trimethylsilyltrifluoracetamid + 1 % Trimethylchlorosilan, das mit gleichen Teilen wasserfreiem Pyridin gemischt werden muss.

Pyridin kann durch die gleiche Menge Acetonitril ersetzt werden.

- 5.3.2. Das Probengläschen verschließen und gründlich (nicht zu stark) schütteln, bis sich die Verbindungen vollständig gelöst haben. Die Probe mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen und dann einige Minuten zentrifugieren. Die klare Lösung kann gaschromatographisch untersucht werden.

Anmerkung 7: Die Beobachtung einer leichten Opaleszenz ist normal und bedeutet keine Anomalie. Die Bildung eines weißen Niederschlags oder der Eindruck einer Rosafärbung sind Anzeichen der Anwesenheit von Feuchtigkeit oder der Zersetzung des Reagens. In diesem Fall soll der Test wiederholt werden (nur bei Verwendung von Hexamethyldisilazan/Trimethylchlorosilan).

- 5.4. Gaschromatographische Analyse

- 5.4.1. Vorbereiten, Einfahren der Kapillarsäule

- 5.4.1.1. Die Säule (Nummer 3.11) in den Gaschromatographen einsetzen, wobei das Einlassteil an den Split-Injektor und das Auslassteil an den Detektor angeschlossen wird.

Überprüfung des Gaschromatographen (Dichtigkeit der Gasleitungen, Betriebsbereitschaft des Detektors, des Trennsystems, des Schreibers usw.).

- 5.4.1.2. Wird die Säule zum ersten Mal verwendet, ist es ratsam, sie einzufahren: Einen schwachen Gasstrom durch die Säule selbst geben, den Gaschromatographen einschalten und allmählich auf eine Temperatur von mindestens 20 °C über der Arbeitstemperatur (Anmerkung 8) aufheizen. Diese Temperatur ist mindestens 2 Stunden konstant zu halten, und dann sind die Analysenbedingungen einzustellen (Gasstrom, Split, Zünden der Flamme, Rechensystemanschluss, Einstellen der Ofentemperatur, Injektor, Detektor). Dann eine Empfindlichkeit wählen, die mindestens doppelt so groß ist wie bei der Durchführung der Analyse. Die Grundlinie muss linear verlaufen, ohne Peaks oder Drift.

Eine negative Drift ist ein Indiz für einen undichten Anschluss der Säule, eine positive deutet auf ein mangelhaftes Einfahren der Säule hin.

Anmerkung 8: Die Einfahrtstemperatur muss in jedem Fall 20 °C unter der für die stationäre Phase angegebenen Maximaltemperatur liegen.

- 5.4.2. Wahl der Arbeitsbedingungen

- 5.4.2.1. Arbeitsbedingungen:

- Säulentemperatur: 260 ± 5 °C;
- Injektortemperatur: 280-300 °C;
- Detektortemperatur: 280-300 °C;
- Strömungsgeschwindigkeit: Helium 20-35 cm/s; Wasserstoff 30-50 cm/s;

- Splitverhältnis: 1:50–1:100;
- Geräteempfindlichkeit: das 4- bis 16fache der Mindestdämpfung;
- Detektorempfindlichkeit: 1–2 mV f. s.;
- Einspritzvolumen: 0,5–1 µl TMSE-Lösung.

Diese Bedingungen können entsprechend den Charakteristiken der Säule und des Gaschromatographen derart geändert werden, dass die damit aufgezeichneten Chromatogramme folgende Bedingungen erfüllen:

- die Retentionszeit von β -Sitosterin muss 20 ± 5 Minuten betragen;
- der Campesterin-Peak muss bei Olivenöl (Durchschnittsgehalt 3 %) 20 ± 5 % des Skalenbereichs und bei Sojaöl (Durchschnittsgehalt 20 %) 80 ± 10 % des Skalenbereichs betragen;
- alle enthaltenen Sterine müssen getrennt werden; die anderen Peaks müssen ebenfalls völlig aufgelöst sein, d. h. der Peakverlauf muss auf die Grundlinie zurückführen, bevor der nächste Peak beginnt; eine unvollständige Auflösung ist nur unter der Bedingung akzeptabel, dass der RRT-1,02-Peak (Sitostanol) mit Hilfe der Senkrechten quantitativ zu bestimmen ist.

5.4.3. Durchführung der Analyse

- 5.4.3.1. Mit der 10-µl-Mikroliterspritze 1 µl Hexan entnehmen, 0,5 µl Luft und anschließend 0,5–1 µl Probenlösung aufziehen; dabei den Kolben der Spritze so weit einziehen, dass die Nadel leer ist. Die Nadel in die Membran des Injektors einführen, nach 1–2 Sekunden schnell einspritzen, dann nach etwa 5 Sekunden die Nadel langsam herausziehen.

Es kann auch ein automatischer Injektor verwendet werden.

- 5.4.3.2. Das Chromatogramm aufzeichnen, bis die TMSE der Triterpen-Dialkohole eluiert sind. Die Grundlinie muss stets den vorgeschriebenen Anforderungen (Nummer 5.4.1.2) genügen.

5.4.4. Identifizierung der Peaks

Die einzelnen Peaks werden anhand der Retentionszeiten und durch Vergleich mit dem unter denselben Bedingungen analysierten Gemisch der Sterine und TMSE der Triterpen-Dialkohole bestimmt (siehe Anlage).

Die Sterine und Triterpen-Dialkohole werden in folgender Reihenfolge eluiert: Cholesterin, Brassicasterin, Ergosterin, 24-Methylen-Cholesterin, Campesterin, Campestanol, Stigmasterin, Δ^7 -Campesterin, $\Delta^5,23$ -Stigmastadienol, Clerosterin, β -Sistosterin, Sitostanol, Δ^5 -Avenasterin, $\Delta^5,24$ -Stigmastadienol, Δ^7 -Stigmastenol, Δ^7 -Avenasterin, Erythrodiol und Uvaol.

In Tabelle 1 sind die Retentionszeiten relativ zu β -Sitosterin für eine SE-52- und SE-54-Säule aufgeführt.

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen die typischen Chromatogramme einiger Öle.

5.4.5. Quantitative Bestimmung

- 5.4.5.1. Mit Hilfe des Rechensystems werden die Peak-Flächen von α -Cholestanol und der Sterine und Triterpen-Dialkohole berechnet. Dabei sind etwa auftretende Peaks von Verbindungen, die in Tabelle I nicht aufgeführt sind, nicht zu berücksichtigen (Ergosterin darf nicht berechnet werden). Der Responsefaktor von α -Cholestanol soll gleich 1 gesetzt werden.

- 5.4.5.2. Der Gehalt an den einzelnen Sterinen in mg/kg Fett wird nach folgender Formel berechnet:

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

Darin bedeuten:

A_x = Peakfläche des Sterins x in Computer-Counts,

A_s = Peakfläche von α -Cholestanol in Computer-Counts,

m_s = zugesetzte Menge an α -Cholestanol in mg,

m = Menge der für die Bestimmung entnommenen Probe in g.

6. ERGEBNISSE

- 6.1. Der Gehalt an den einzelnen Sterinen wird in mg/kg Öl angegeben, ihre Summe als „Gesamtsterine“.

Die Zusammensetzung der einzelnen Sterine sowie des Erythrodiols und des Uvaols wird mit einer Dezimalstelle angegeben.

Die Sterinzusammensetzung ist ohne Dezimalstelle anzugeben.

- 6.2. Der prozentuale Anteil jedes einzelnen Sterins errechnet sich aus dem Quotienten der Peakfläche des entsprechenden Peaks und der Summe der Peakflächen aller Sterine sowie des Erythrodiol und des Uvaols nach der Formel:

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

Darin bedeuten:

A_x = Peakfläche des Sterins x ,

ΣA = Summe der Peakfläche aller Sterine.

- 6.3. Apparentes β -Sitosterin: $\Delta 5$ -23-Stigmastadienol + Clerosterin + β -Sitosterin + Sitostanol + $\Delta 5$ -Avenasterin + $\Delta 5$ -24-Stigmastadienol.

- 6.4. Der prozentuale Anteil der Erythrodiols und Uvaols errechnet sich nach der Formel:

$$\text{Erythrodiol} + \text{Uvaol} = \frac{Er + Uv}{Er + Uv + \Sigma A} \times 100$$

Darin bedeuten:

ΣA = Gesamtfläche von Sterin in Computer-Counts;

Er = Fläche des Erythrodiols in Computer-Counts;

Uv = Fläche des Uvaols in Computer-Counts;

Anlage

Bestimmung der linearen Strömungsgeschwindigkeit

In den auf Normalbedingungen eingestellten Gaschromatographen werden 1 bis 3 µl Methan (oder Propan) eingespritzt und bis zum Peak-Austritt (tM) gemessen.

Die lineare Strömungsgeschwindigkeit in cm/s ist durch die Beziehung L/t_M definiert; dabei ist L die Länge der Säule in cm und tM die gemessene Zeit in Sekunden.

Table 1

Relative Retentionszeit der Sterine

Peak	Identifizierung		Relative Retentionszeit	
			SE 54	SE 52
1	Cholesterin	Δ -5-Cholesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	Cholestanol	5 α -Cholestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brassicasterin	[24S]-24-Methyl- Δ -5,22-Cholestadien-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergosterin	[24S] 24 Methy Δ 5-7-22 Cholestatrien 3 β -ol	0,78	0,76
4	24-Methylen-Cholesterin	24-Methylen- Δ -5,24-Cholestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	Campesterin	(24R)-24-Methyl- Δ -5-Cholesten-3 β -ol	0,83	0,81
6	Campestanol	(24R)-24-Methyl-Cholestan-3 β -ol	0,85	0,82
7	Stigmasterin	(24S)-24-Ethyl- Δ -5,22-Cholestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-Campesterin	(24R)-24-Methyl- Δ -7-Cholesten-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-Stigmastadienol	(24R,S)-24-Ethyl- Δ -5,23-Cholestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	Clerosterin	(24S)-24-Ethyl- Δ -5,25-Cholestadien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -Sitosterin	(24R)-24-Ethyl- Δ -5-Cholesten-3 β -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-Ethyl-Cholestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-Avenasterin	(24Z)-24-ethylidene- Δ -Cholesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5-24-Stigmastadienol	(24R,S)-24-Ethyl- Δ -5,24-Cholestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-Stigmastenol	(24R,S)-24-Ethyl- Δ -7-Cholesten-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-Avenasterin	(24Z)-24-Ethyliden- Δ -7-Cholesten-3 β -ol	1,16	1,16
17	Erythrodiol	5 α Olean-12en-3 β 28 diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-Ursen-3 β 28 diol	1,52	1,52

Abbildung 1

Gaschromatogramm der Sterin- und Triterpen-Dialkohol-Fraktion von Lampantöl (mit dem internen Standard versetzt)

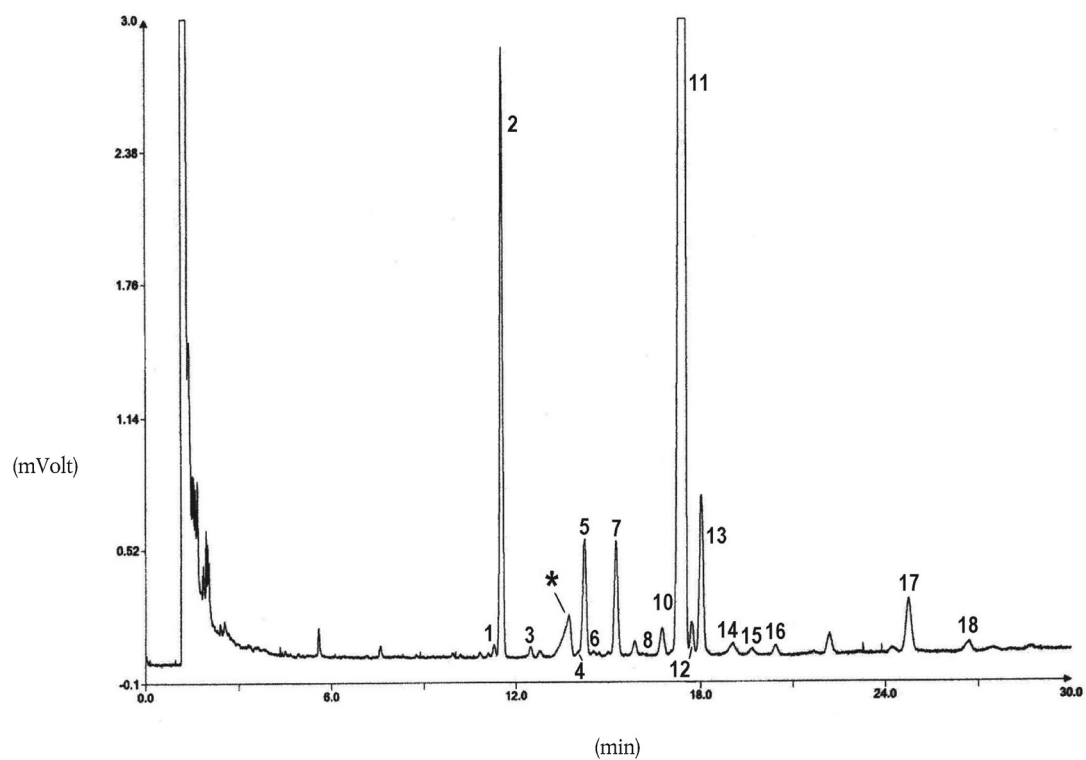


Abbildung 2

Gaschromatogramm der Sterin- und Triterpen-Dialkohol-Fraktion von raffiniertem Olivenöl (mit dem internen Standard versetzt)

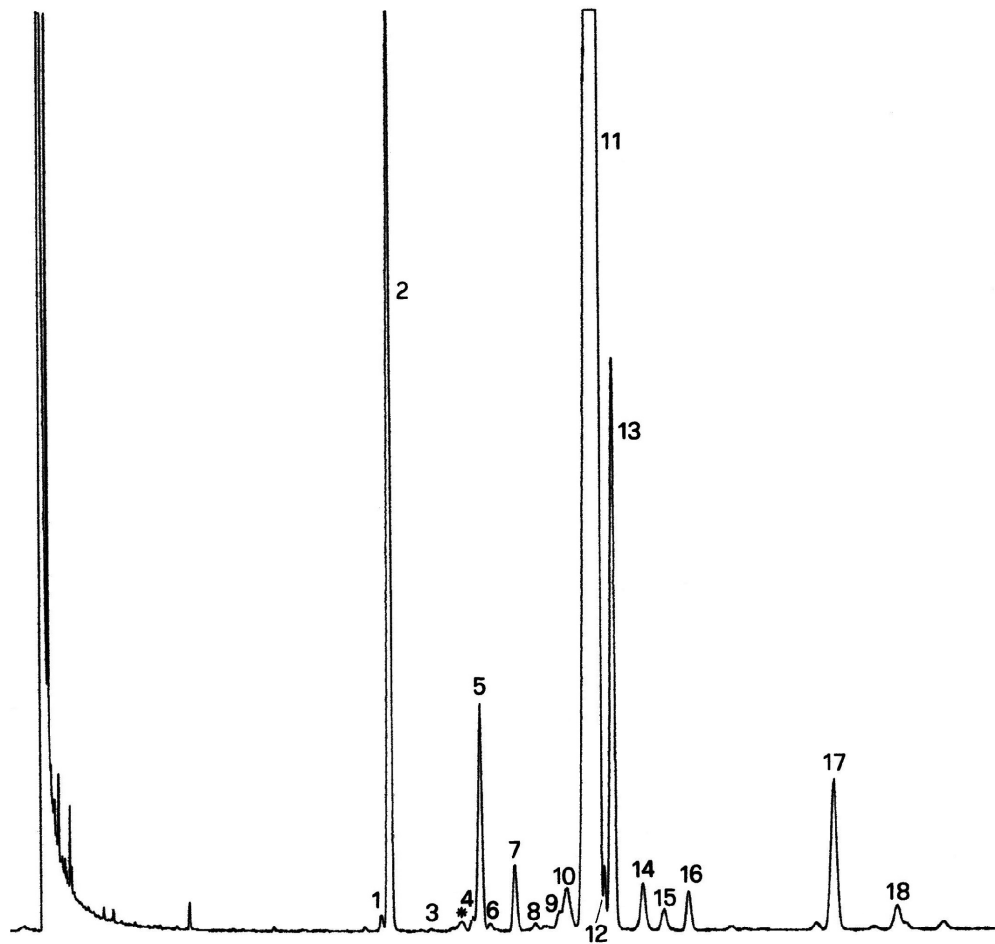
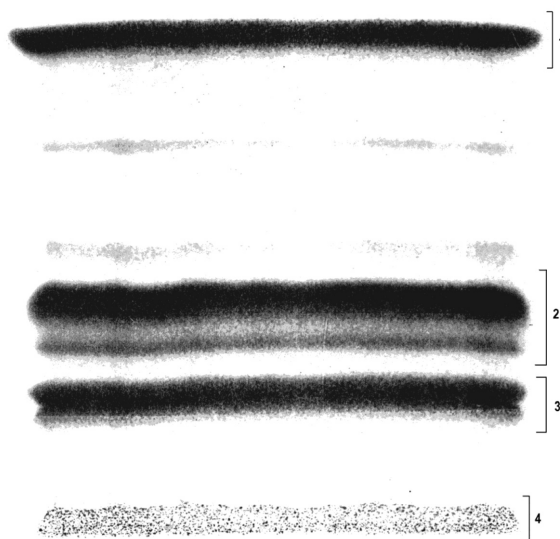


Abbildung 3

Dünnschichtplatte Oliventresteröl mit dem Bereich, der zur Bestimmung der Sterine und Triterpen-Dialkohole abgekratzt werden muss



- 1 – Squalen
- 2 – Triterpen- und aliphatische Alkohole
- 3 – Sterine und triterpenische Dialkohole
- 4 – Beginn und freie Fettsäuren“

ANHANG V

„ANHANG XII

VERFAHREN DES INTERNATIONALEN OLIVENÖLRATES FÜR DIE ORGANOLEPTISCHE PRÜFUNG VON NATIVEN OLIVENÖLEN**1. GEGENSTAND UND ANWENDUNGSBEREICH**

Diese internationale Verfahrensvorschrift dient der Festlegung des Verfahrens für die Bewertung der organoleptischen Merkmale von nativen Olivenölen im Sinne von Nummer 1 des Anhangs XVI der Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 und beschreibt die Methode für die Einstufung der Öle anhand dieser Merkmale. Das Verfahren umfasst zudem Hinweise für eine fakultative Etikettierung.

Die Verfahrensvorschrift gilt nur für native Olivenöle und deren Einstufung bzw. Etikettierung entsprechend dem Umfang der wahrgenommenen Mängel und der Fruchtigkeit, wie sie von einer Gruppe ausgewählter, geschulter und geprüfter Prüfer bestimmt werden.

Sie umfasst zudem Hinweise für eine fakultative Etikettierung.

Die in diesem Anhang angeführten IOR-Standards entsprechen der aktuellsten verfügbaren Fassung.

2. ALLGEMEINE GRUNDBEGRIFFE FÜR DIE SENSORISCHE PRÜFUNG

Vgl. dazu Standard IOC/T.20/Dok. Nr. 4 „Sensory Analysis: General Basic Vocabulary“

3. SPEZIFISCHE BEGRIFFE**3.1. Negative Attribute**

Stichig/schlammig Typisches Flavour bei Ölen aus Oliven, die unter solchen Bedingungen geschichtet oder gelagert sind, dass sie eine fortgeschrittene anaerobe Gärung durchlaufen haben, oder bei Öl, das in Becken und Fässern mit Dekantier-„Schlämmen“ in Kontakt war, die ebenfalls eine anaerobe Gärung durchlaufen haben.

Modrig-feucht-erdig Typisches Flavour bei Ölen aus Früchten mit Schimmel- und Hefepilzbefall wegen mehrtägiger Lagerung unter feuchten Bedingungen, bzw. typisches Flavour bei Ölen, das von anhaftender Erde oder Schlamm ungewaschener Oliven herrührt.

Wein- oder essigartig/sauer-säuerlich Typisches Flavour bei bestimmten Ölen, an Wein oder Essig erinnernd und in erster Linie bedingt durch einen aeroben Gärungsprozess der Oliven oder Reste von Olivenpaste in nicht sachgemäß gewaschenen Pressmatten, bei dem Essigsäure, Ethylacetat und Ethanol entstehen.

Ranzig Flavour bei stark oxidierten Ölen.

Frostgeschädigte Oliven (feuchtes Holz) Typisches Flavour bei Ölen, die aus Oliven gewonnen wurden, die am Baum Frostschäden erlitten haben.

3.2. Sonstige negative Attribute

Brandig oder erhitzt Typisches Flavour bei Ölen aufgrund einer übermäßigen und/oder zu langen Erwärmung bei der Verarbeitung und insbesondere durch unsachgemäße Wärmebehandlung beim Rühren der Olivenpaste.

Heuartig-holzig Typisches Flavour bei bestimmten Ölen, die aus vertrockneten Oliven gewonnen wurden.

Roh Bezeichnung für bestimmte alte Öle, die im Mund einen dickflüssigen, pastösen Sinneseindruck hinterlassen.

Schmierölartig Flavour bei Ölen, das an Dieseltreibstoff, Fett oder Mineralöl erinnert.

Fruchtwasserartig Flavour bei Ölen, das von längerem Kontakt mit Fruchtwasser herrührt, das Gärungsprozesse durchlaufen hat.

Lakig Flavour bei Ölen aus Oliven, die in Salzlake aufbewahrt wurden.

Metallisch An Metall erinnerndes Flavour, typisch für Öl, das beim Vermahlen, Schlagen, Pressen oder Lagern lange mit Metallflächen in Kontakt stand.

Espartograsartig Typisches Flavour bei Ölen aus Oliven, die mit Hilfe neuer Espartograsmatten gepresst wurden. Dieses Aroma kann in verschiedenen Nuancen auftreten, je nachdem, ob Matten aus grünem oder trockenem Espartogras verwendet wurden.

Wurmstichig Flavour bei Ölen aus stark von Larven der Olivenfliege (*Bactrocera oleae*) befallenen Oliven.

Gurkenartig Flavour bei Ölen, das von zu langem Lagern in luftdichten Behältnissen, insbesondere Weißblechdosen, und dem dadurch entstehenden 2,6-Nonadienal herrührt.

3.3. Positive Attribute

Fruchtig Gesamtheit der von der Olivensorte abhängigen, unmittelbar und/oder retronasal wahrgenommenen charakteristischen Geruchsmerkmale eines Öls aus gesunden und frischen, reifen oder unreifen Früchten.

Bitter Elementarer Geschmack, der typisch für Öle aus grünen oder in Reifung befindlichen Oliven ist und mit den auf der Zunge V-förmig angeordneten Wallpapillen wahrgenommen wird.

Scharf Taktil empfundenes Prickeln, das typisch für Öle ist, die zu Beginn des Wirtschaftsjahres hauptsächlich aus noch unreifen Oliven gewonnen werden, und in der gesamten Mundhöhle und insbesondere in der Kehle wahrgenommen werden kann.

3.4. Fakultative Terminologie bei der Etikettierung

Auf Antrag kann der Prüfungsleiter bescheinigen, dass die bewerteten Öle nach Intensität und Wahrnehmung der Attribute den Definitionen und Intervallen für die nachstehenden Adjektive entsprechen.

Positive Attribute (fruchtig, bitter und scharf): Je nach Intensität der Wahrnehmung:

- *intensiv*, wenn der Median des betreffenden Attributs größer als 6 ist;
- *mittel*, wenn der Median des betreffenden Attributs zwischen 3 und 6 liegt;
- *leicht*, wenn der Median des betreffenden Attributs kleiner als 3 ist.

Fruchtig Gesamtheit der von der Olivensorte abhängigen, unmittelbar und/oder retronasal wahrgenommenen charakteristischen Geruchsmerkmale eines Öls aus gesunden, frischen Oliven, bei dem weder grüne noch reife Fruchtigkeit vorherrscht.

Grünlich-fruchtig Gesamtheit der von der Olivensorte abhängigen, unmittelbar und/oder retronasal wahrgenommenen charakteristischen Geruchsmerkmale eines Öls aus grünen, gesunden, frischen Oliven, das an grüne Früchte erinnert.

Reif-fruchtig Gesamtheit der von der Olivensorte abhängigen, unmittelbar und/oder retronasal wahrgenommenen charakteristischen Geruchsmerkmale eines Öls aus grünen, gesunden, frischen Oliven, das an reife Früchte erinnert.

Ausgewogen Ein Öl, das nicht unausgewogen ist. Unausgewogenheit bezeichnet den olfaktorisch-gustatorischen und taktilen Sinneseindruck bei einem Öl, in dem der Median des Attributs „bitter“ und/oder der des Attributs „scharf“ um zwei Punkte größer ist als der Median des Attributs „fruchtig“.

Mildes Öl Ein Öl, in dem der Median des Attributs bitter und der des Attributs scharf kleiner oder gleich 2 sind.

4. PRÜFGLAS FÜR ÖLE

Vgl. hierzu den Standard IOC/T.20/Dok. Nr. 5, „Glass for Oil Tasting“.

5. PRÜFRAUM

Vgl. hierzu den Standard IOC/T.20/Dok. Nr. 6, „Guide for the Installation of a Test Room“.

6. ZUBEHÖR

Jedem Prüfer ist in seiner Kabine das folgende zur Erfüllung seiner Aufgabe notwendige Zubehör zur Verfügung zu stellen:

- Gläser (genormt) mit den Proben, mit Code-Nummer versehen, mit einem Uhrglas abgedeckt und bei 28 °C ± 2 °C gehalten;
- Profilbeschreibung („Profile Sheet“, siehe Abbildung 1) auf Papier oder in elektronischer Form, sofern die Vorgaben für die Profilbeschreibung erfüllt sind, sowie gegebenenfalls Ausfüllanweisungen;
- Kugelschreiber oder dokumentenechte Tinte;
- Schälchen mit Apfelstücken und/oder Wasser, kohlenensäurehaltiges Wasser und/oder Zwieback;
- Glas Wasser von Raumtemperatur;
- Hinweisbogen zu den allgemeinen Regeln in Abschnitt 8.4 und 9.1.1;
- Spucknapfe.

7. PRÜFUNGSLEITER UND PRÜFER

7.1. Prüfungsleiter

Der Prüfungsleiter muss ausreichend vorgebildet sein und über das nötige Fachwissen für die zu Beurteilung anstehenden Olivenöle verfügen. Er ist die Schlüsselfigur der Prüfergruppe und trägt die Verantwortung für Organisation und Ablauf der Prüfungsarbeit.

Die Arbeit des Prüfungsleiters erfordert eine Grundausbildung im Umgang mit den Hilfsmitteln der sensorischen Analyse, sensorisches Feingefühl, Sorgfalt bei der Vorbereitung, Organisation und Durchführung der Prüfungen sowie das nötige Können und die Geduld für deren wissenschaftliche Planung und Abwicklung.

Der Prüfungsleiter ist alleinverantwortlich für die Auswahl, die Schulung und die Überwachung der Prüfer auf ihre Eignung. Somit obliegt ihm die Beurteilung der Prüfer, die stets objektiv sein muss und für die der Prüfungsleiter konkrete Verfahren entwickeln muss, die auf Tests und auf soliden Zulassungs- und Ausschlusskriterien beruhen. Siehe dazu den Standard IOC/T.20/Dok. Nr. 14, „Guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil tasters“.

Der Prüfungsleiter ist verantwortlich für die Leistung der Gruppe und somit auch für ihre Bewertung, für die er zuverlässige objektive Nachweise erbringen muss. In jedem Falle muss er jederzeit nachweisen können, dass die Methodik und die Prüfer unter Aufsicht stehen. Es wird empfohlen, in regelmäßigen Abständen eine Neukalibrierung der Gruppe vorzunehmen (IOC/T.20/Dok. Nr. 14, § 5).

Er ist in letzter Instanz für das Führen der Aufzeichnungen der Gruppe verantwortlich. Diese Aufzeichnungen müssen stets nachverfolgbar sein. Sie müssen den Leistungs- und Qualitätsanforderungen internationaler Standards für die sensorische Prüfung entsprechen und jederzeit die Anonymität der Proben gewährleisten.

Der Prüfungsleiter ist verantwortlich für das Vorhandensein sowie die ordnungsgemäße Reinigung und Instandhaltung der Hilfsmittel und Ausrüstungsgegenstände, die für die vorschriftsmäßige Anwendung dieser Methode erforderlich sind, und führt darüber sowie über die Einhaltung der Prüfbedingungen Buch.

Ihm obliegen die Entgegennahme und Lagerung der im Labor eintreffenden Proben sowie deren Lagerung nach erfolgter Prüfung. Dabei hat er jederzeit sicherzustellen, dass die Proben anonym bleiben und ordnungsgemäß gelagert werden; zu diesem Zweck muss er ein schriftliches Verfahren entwickeln, das die Rückverfolgbarkeit des gesamten Prozesses gewährleistet und Sicherheiten bietet.

Darüber hinaus ist er verantwortlich für die Vorbereitung, die Kodierung und die Übergabe der Proben an die Prüfer unter Einhaltung eines geeigneten Versuchsplans und vorgegebener Protokolle sowie für das Einsammeln und die statistische Auswertung der von den Prüfern ausgehändigten Prüfdaten.

Er ist zuständig für die Entwicklung und Darlegung etwaiger sonstiger Verfahren, die in Ergänzung zu diesem Standard erforderlich sind, um eine ordnungsgemäße Arbeitsweise der Gruppe sicherzustellen.

Er bemüht sich um Vergleiche der Ergebnisse der Gruppe mit den Ergebnissen anderer Gruppen, die natives Olivenöl prüfen, um festzustellen, ob die Gruppe ordnungsgemäß arbeitet.

Aufgabe des Prüfungsleiters ist es, die Mitglieder zu motivieren und bei ihnen Interesse, Neugier und Wettbewerbsgeist zu wecken. Daher wird ihm nachdrücklich empfohlen, einen reibungslosen beiderseitigen Informationsfluss mit den Mitgliedern der Gruppe sicherzustellen, indem er sie ständig über seine Arbeitsaufgaben und über die gewonnenen Ergebnisse auf dem Laufenden hält. Zudem hat er sich einer Meinungsäußerung zu enthalten und muss sicherstellen, dass möglicherweise tonangebende Prüfer die anderen nicht beeinflussen.

Er lädt die Prüfer rechtzeitig ein und beantwortet etwaige Fragen hinsichtlich der Durchführung der Prüfungen, enthält sich aber jedweder Meinungsäußerung über die Proben.

7.2. Prüfer

Die Personen, die an der organoleptischen Prüfung von Olivenöl als Prüfer teilnehmen, müssen dies freiwillig tun und sich allen damit verbundenen Konsequenzen unterwerfen, was die Pflichten und die fehlende finanzielle Vergütung angeht. Daher sind schriftliche Bewerbungen anzuraten. Der Prüfungsleiter hat die Bewerber zu schulen und entsprechend ihrer Eignung zur Unterscheidung ähnlicher Proben auszuwählen, wobei zu berücksichtigen ist, ob und inwieweit ihre Urteilsfähigkeit im Zuge der Schulung zunimmt.

Die Prüfer müssen in sensorischer Hinsicht eine rein beobachtende Funktion ausüben, ihre persönlichen geschmacklichen Vorlieben außer Acht lassen und lediglich ihre Sinneseindrücke wiedergeben. Dabei kommt es darauf an, dass sie ihre Arbeit stets schweigend sowie entspannt und ohne Eile verrichten, um der zu prüfenden Probe maximale sensorische Aufmerksamkeit widmen zu können.

Für jede Prüfung werden 8 bis 12 Prüfer benötigt, nebst einigen Reserveprüfern zur Deckung von Ausfällen.

8. PRÜFBEDINGUNGEN

8.1. Präsentation der Probe

Die zu prüfenden Olivenölproben werden in standardisierten Prüfgläsern dargereicht, die dem Standard IOC/T.20/Dok. Nr. 5 „Glass for oil tasting“ entsprechen.

Ein Glas enthält 14–16 ml Öl - bzw. 12,8 bis 14,6 g Öl, falls die Proben gewogen werden sollen – und ist mit einem Uhrglas bedeckt.

Jedes Glas wird mit einem willkürlich ausgewählten Code aus Ziffern oder aus einer Kombination von Buchstaben und Ziffern versehen. Der Code wird mit Hilfe eines geruchsfreien Systems angebracht.

8.2. Prüf- und Probentemperatur

Die zur Prüfung anstehenden Proben sind während der gesamten Prüfung im Glas auf einer Temperatur von $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ zu halten. Diese Temperatur wurde gewählt, weil sich die organoleptischen Unterschiede auf diese Weise leichter erfassen lassen als bei Umgebungstemperatur und weil die Aromastoffe dieser Öle bei niedrigeren Temperaturen kaum zur Entfaltung kommen, während sich bei höheren Temperaturen die für erhitzte Öle typischen Aromastoffe bilden. Siehe dazu den Standard IOC/T.20/Dok. Nr. 5 „Glass for Oil Tasting“, in dem die Methode zur Erwärmung der Proben im Glas beschrieben wird.

Im Prüfraum muss eine Temperatur zwischen 20 °C und 25 °C herrschen (siehe IOC/T.20/Dok. Nr. 6).

8.3. Prüfungszeiten

Die für das Verkosten von Olivenöl geeignetste Tageszeit ist der Vormittag. Geruchs- und Geschmackssinn sind zu bestimmten Tageszeiten nachweislich besonders empfindlich. So ist die Empfindlichkeit von Geruchs- und Geschmackssinn vor den Mahlzeiten besonders groß und geht danach zurück.

Übertreibung ist aber auch hier zu vermeiden, da Hungergefühle die Prüfer ablenken und so ihr Unterscheidungsvermögen beeinträchtigen; es wird daher empfohlen, die Prüfgänge zwischen 10.00 und 12.00 Uhr durchzuführen.

8.4. Prüfer: allgemeine Verhaltensmaßregeln

Die folgenden Empfehlungen gelten für das Verhalten der Prüfer bei ihrer Arbeit.

Wer vom Prüfungsleiter zur Teilnahme an einer organoleptischen Prüfung aufgefordert wurde, muss zu der ihm genannten Uhrzeit zur Teilnahme in der Lage sein und hat dazu folgende Vorschriften zu beachten:

- Er stellt mindestens 30 Minuten vor der festgesetzten Uhrzeit das Rauchen und Kaffeetrinken ein.
- Parfüm, Kosmetika oder Seife, deren Geruch bei der Prüfung noch wahrnehmbar ist, darf nicht verwendet werden. Zum Händewaschen ist unparfümierte Seife zu verwenden; dabei sind die Hände so lange mit Wasser nachzuspülen und abzutrocknen, bis jedweder Geruch beseitigt ist.
- Der Prüfer muss bei Prüfungsantritt seit mindestens einer Stunde nüchtern sein.
- Wer an einer Unpässlichkeit und insbesondere einer Beeinträchtigung des Geruchs- oder Geschmacksempfindens oder an einer die Konzentrationsfähigkeit beeinflussenden psychischen Belastung leidet, sieht von der Verkostung ab und informiert den Prüfungsleiter entsprechend.
- Der die vorstehenden Vorschriften erfüllende Prüfer sucht die ihm zugewiesene Kabine auf; dies hat so leise und diskret wie möglich zu geschehen.
- Er liest die Hinweise auf dem Prüfbogen sorgfältig durch und beginnt erst dann mit der Prüfung der Proben, wenn er sich über seine Aufgabe vollends im Klaren ist (entspannt und ohne Eile). Unklarheiten sind mit dem Prüfungsleiter unter vier Augen zu klären.
- Er verrichtet seine Arbeit schweigend.
- Er hat sein Mobiltelefon für die gesamte Dauer der Prüfung abgeschaltet, damit die Kollegen nicht in ihrer Konzentration beeinträchtigt und bei ihrer Arbeit gestört werden.

9. VERFAHREN FÜR DIE ORGANOLEPTISCHE BEWERTUNG UND EINSTUFUNG VON NATIVEM OLIVENÖL

9.1. Verkostungsverfahren

- 9.1.1. Der Prüfer nimmt das Glas zur Hand, hält es dabei mit dem Uhrglas bedeckt schräg und schwenkt es dabei einmal ganz um, damit die Innenseite möglichst ganz benetzt wird. Er lüftet das Uhrglas und inhaliert das Bukett der Probe in leichten, ruhigen und langen Zügen durch die Nase so lange, bis er sich ein Urteil über die zur Prüfung anstehende Probe gebildet hat. Das eigentliche Riechen darf nicht länger als 30 Sekunden dauern. Gelangt er nach dieser Zeit nicht zu einem Urteil, legt er eine kleine Pause ein und macht einen weiteren Versuch.

Nach dem Riechen prüft er das Flavour (Gesamtsinnesindruck aus Geruchs-, Geschmacks- und Tastempfindung). Dazu nippt er einen kleinen Schluck Öl von etwa 3 ml. Sehr wichtig ist, dass alle geschmacksempfindlichen Teile des Mundes mit dem Öl benetzt werden, vom vorderen Teil des Mundes und der Zungenspitze über die Ränder des Zungenrückens bis zur Zungenwurzel und zur Kehle, da die Geschmackswahrnehmung und die taktilen Wahrnehmungen an verschiedenen Stellen der Zunge, des Gaumens und der Kehle unterschiedlich stark sind.

Es ist unbedingt darauf zu achten, dass genügend Olivenöl von der Zungenspitze bis zum Gaumen und zur Zungenwurzel langsam verteilt wird, wobei auf die Reihenfolge des Auftretens der Bitterkeit und der Schärfe zu achten ist. Anderenfalls kann es bei manchen Olivenölen vorkommen, dass beide Sinnesindrücke nicht wahrgenommen werden oder die Bitterkeit von der Schärfe verdeckt wird.

Durch kurzes, wiederholtes Einsaugen von Luft durch den Mund wird die Probe in der gesamten Mundhöhle verteilt, so dass die flüchtigen Aromastoffe zwangsläufig über den Gaumen in die Nase gelangen.

Auch die taktile Wahrnehmung von Schärfe sollte berücksichtigt werden. Dafür ist es ratsam, das Öl hinunterzuschlucken.

- 9.1.2. Es wird empfohlen, bei der organoleptischen Prüfung von nativem Olivenöl maximal VIER PROBEN in jedem Prüfungsgang zu bewerten und maximal drei Prüfungsgänge pro Tag durchzuführen, damit keine Kontrastwirkungen durch das sofortige Verkosten anderer Proben auftreten.

Da es bei aufeinanderfolgenden Prüfungsgängen zu Ermüdungserscheinungen oder zur Dämpfung der Sinneswahrnehmung durch die vorherigen Proben kommt, sind die Ölreste des vorherigen Prüfungsgangs mit einem geeigneten Mittel aus dem Mund zu entfernen.

Dazu empfiehlt sich ein kleines Stück Apfel, das nach dem Kauen ausgespuckt werden kann; anschließend ist der Mund mit Wasser von Zimmertemperatur zu spülen. Zwischen dem Ende eines Prüfungsgangs und dem Beginn des nächsten müssen mindestens 15 Minuten vergehen.

9.2. Verwendung der Profilbeschreibung durch den Prüfer

Die zu verwendende Profilbeschreibung ist in Abbildung 1 dieses Anhangs dargestellt.

Jeder zur Prüfergruppe gehörende Prüfer muss das zu untersuchende Öl zunächst riechen und dann verkosten⁽¹⁾. Anschließend trägt er auf der 10-cm-Skala in der vorliegenden Profilbeschreibung die Intensität der Wahrnehmung jedes negativen und positiven Attributs ein.

Werden negative Attribute wahrgenommen, die nicht in Abschnitt 4 aufgeführt sind, so sind diese unter Verwendung derjenigen Begriffe, mit denen sie am zutreffendsten beschrieben werden, im Feld „Sonstige“ anzugeben.

9.3. Verwendung der Angaben durch den Prüfungsleiter

Der Prüfungsleiter sammelt die ausgefüllten Profilbeschreibungen der einzelnen Prüfer ein, um die den einzelnen Attributen zugeteilten Intensitäten zu überprüfen; bei Feststellung einer Anomalie fordert er den Prüfer auf, seine Profilbeschreibung zu überarbeiten und den Prüfversuch erforderlichenfalls zu wiederholen.

Der Prüfungsleiter gibt die Bewertungsdaten der einzelnen Mitglieder der Prüfergruppe in ein Computerprogramm entsprechend dem Standard IOC/T.20/Dok. Nr. 15 ein, um eine statistische Berechnung der Analyseergebnisse auf Grundlage der Berechnung des Medians vorzunehmen; siehe dazu Abschnitt 9.4 dieses Anhangs und die dazugehörige Anlage. Die Daten für eine Probe werden eingegeben anhand einer Matrix aus 9 Spalten, die jeweils den 9 sensorischen Attributen entsprechen, und n Zeilen, die den n Prüfern der Prüfergruppe entsprechen.

Wird ein von mindestens 50 % der Mitglieder der Prüfergruppe wahrgenommener Mangel unter „Sonstige“ eingetragen, so berechnet der Prüfungsleiter den Median dieses Mangels und nimmt die entsprechende Einstufung vor.

Der Wert des robusten Variationskoeffizienten, der die Einstufung bestimmt (Mangel mit der größten Intensität und Attribut „fruchtig“), muss kleiner oder gleich 20 % sein.

Ist dies nicht der Fall, muss der Prüfungsleiter für eine erneute Bewertung der spezifischen Probe in einem weiteren Prüfungsgang sorgen.

Sollte dies häufig vorkommen, wird dem Prüfungsleiter empfohlen, eine spezifische Fortbildung für die Prüfer durchzuführen (IOC/T.20/Dok. Nr. 14, § 5) und die Prüfungsleistung der Gruppe anhand des Wiederholbarkeitsindex und des Abweichungsindex zu beurteilen (IOC/T.20/Doc. Nr. 14, § 6).

9.4. Einstufung der Öle

Das Öl wird entsprechend dem Median der festgestellten Mängel und dem Median des Attributs „fruchtig“ in die nachstehenden Kategorien eingestuft. Der Median der Mängel ist definiert als der Median des mit der stärksten Intensität wahrgenommenen Mangels. Der Median der Mängel und der Median der Fruchtigkeit werden mit einer Dezimalstelle ausgedrückt.

⁽¹⁾ Der Prüfer kann vom Verkosten eines Öls absehen, wenn er direkt über den Geruch ein extrem stark ausgeprägtes negatives Attribut feststellt. Er vermerkt diesen außergewöhnlichen Umstand in der Profilbeschreibung.

Für die Einstufung des Öls wird der Wert des Medians der Mängel und des Medians der Fruchtigkeit mit den nachstehend aufgeführten Referenzintervallen verglichen. Die Grenzen dieser Intervalle wurden unter Berücksichtigung des Fehlers der Methode festgesetzt und gelten daher als absolut. Eine entsprechende Computer-Software gestattet eine visuelle Darstellung der Einstufung in tabellarischer oder grafischer Form.

- (a) Natives Olivenöl extra: der Median der Mängel ist 0 und der Median des Attributs „fruchtig“ ist größer als 0.
- (b) Natives Olivenöl: der Median der Mängel ist größer als 0, aber nicht größer als 3,5 und der Median des Attributs „fruchtig“ ist größer als 0.
- (c) Lampantöl: der Median der Mängel ist größer als 3,5 oder der Median der Mängel ist nicht größer als 3,5 und der Median des Attributs „fruchtig“ ist gleich 0.

Anmerkung 1:

Liegt der Median des Attributs „bitter“ und/oder der des Attributs „scharf“ über 5,0, so vermerkt der Prüfungsleiter dies auf der Prüfbescheinigung.

Abbildung 1

PROFILBESCHREIBUNG VON NATIVEM OLIVENÖL

Intensität der wahrnehmung der mängel		
Stichig/schlammig (*)		
Modrig/feucht/erdig (*)		
Wein-/essigartig		
Sauer/säuerlich (*)		
Frostgeschädigte Oliven (feuchtes Holz)		
Ranzig		
Sonstige negative Attribute:		
Deskriptor:	Metallisch ☐ Heuartig ☐ Wurmstichig ☐ Roh ☐ Lakig ☐ Brandig oder erhitzt ☐ Fruchtwasserartig ☐ Espartograsartig ☐ Gurkenartig ☐ Schmierölartig ☐	
(*) Nichtzutreffendes streichen		
Intensität der wahrnehmung der positiven attribute		
Fruchtig		
	Grün ☐	Reif ☐
Bitter		
Scharf		
Name des Prüfers:		Code-Nr. des Prüfers:
Code-Nr. der Probe:	Unterschrift:	

Anlage

Methode zur Berechnung des Medians und der Vertrauensintervalle**Median**

$$Me = [p(X < x_m) \leq 1/2 \wedge p(X \leq x_m) \geq 1/2]$$

Der Median ist definiert als die reelle Zahl x_m , gekennzeichnet durch die Tatsache, dass die Wahrscheinlichkeit (p), dass die Werte der Verteilung (X) unter dieser Zahl (x_m) liegen, geringer oder gleich 0,5 ist, und dass gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit (p), dass die Werte der Verteilung (X) unter dieser Zahl x_m liegen oder ihr entsprechen, höher oder gleich 0,5 ist. Nach einer praktischeren Definition ist der Median das 50. Perzentil einer Zahlenverteilung in steigender Reihenfolge. Einfacher ausgedrückt: Der Median ist der Wert in der Mitte einer geordneten Datenreihe, wenn es sich um eine ungerade Anzahl von Datenwerten handelt, bzw. entspricht dem Durchschnitt der beiden mittleren Werte, wenn es sich um eine gerade Anzahl von Datenwerten handelt.

Robuste Standardabweichung

Um eine zuverlässige Schätzung für die Variabilität um den Mittelwert zu erhalten, ist der Schätzwert der robusten Standardabweichung nach Stuart und Kendall heranzuziehen (4). Die Formel ergibt die asymptotische Standardabweichung, d. h. den robusten Schätzwert der Variabilität der betreffenden Angaben, wobei N die Zahl der Beobachtungen und IQR der Quartilabstand ist, der genau 50 % der Fälle einer gegebenen Wahrscheinlichkeitsverteilung umfasst:

$$s^* = \frac{1,25 \times \text{IQR}}{1,35 \times \sqrt{N}}$$

Zur Berechnung des Quartilabstands wird die Größe der Abweichung zwischen dem 75. und 25. Perzentil berechnet.

$$\text{IQR} = 75. \text{ Perzentil} - 25. \text{ Perzentil}$$

Dabei ist das Perzentil der Wert x_{pc} , gekennzeichnet durch die Tatsache, dass die Wahrscheinlichkeit (p), dass die Werte der Verteilung unter x_{pc} liegen, niedriger als ein bestimmtes Hundertstel ist oder ihm entspricht und dass gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit (p), dass die Werte der Verteilung niedriger als x_{pc} sind oder ihm entsprechen, höher als das bestimmte Hundertstel ist oder ihm entspricht. Das Hundertstel gibt das gewählte Fraktile der Verteilung an. In Fall des Medians entspricht es 50/100.

$$\text{Perzentil} = [p(X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge p(X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

In der Praxis ist das Perzentil der Verteilungswert, der einem bestimmten Bereich unterhalb der Verteilungs- oder Dichtekurve entspricht. Beispiel: das 25. Perzentil ist der Verteilungswert, der einem Bereich von 0,25 oder 25/100 entspricht.

Bei dieser Methode werden Perzentile auf der Grundlage der realen Werte berechnet, die in der Datenmatrix erscheinen (Perzentilberechnungsverfahren).

Robuster Variationskoeffizient (%)

Der CVr% stellt eine reine Zahl dar, die den Prozentsatz der Variabilität des analysierten Zahlensatzes angibt. Daher ist dieser Koeffizient zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der Mitglieder der Prüfergruppe besonders geeignet.

$$CV_r = \frac{s^*}{Me} \times 100$$

Vertrauensintervalle des Medians bei 95 %

Das Vertrauensintervall von 95 % (der Wert des Fehlers erster Art entspricht 0,05 oder 5 %) ist das Intervall, in dem der Median, ausgehend von der Hypothese, dass sich der Versuch unendliche Male wiederholen ließe, schwanken könnte. In der Praxis gibt es das Variabilitätsintervall des Versuchs unter den vorgegebenen operationellen Bedingungen an, in der Annahme, dass der Versuch viele Male wiederholt werden könnte. Das Intervall ist, wie der CVr%, nützlich zur Beurteilung der Zuverlässigkeit des Versuchs.

$$IC_{sup} = Me + (c \times s^*)$$

$$IC_{inf} = Me - (c \times s^*)$$

wobei $C = 1,96$ bei einem Vertrauensintervall auf 95%-Niveau.

Ein Beispiel für den Berechnungsbogen ist in Anhang I des Standards IOC/T20/Dok. Nr. 15 enthalten.

Literaturhinweise

- (1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL.SYSTAT Inc.
 - (2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica. Maggioli Editore, Rimini.
 - (3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook. Elsevier. Amsterdam.
 - (4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1. Hafner Publishing Co.
 - (5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots. The American Statistician, 32, (2), 12-16.
 - (6) IOC/T.28/Dok. Nr. 1 September 2007, Guidelines for the accreditation of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil according to standard ISO/IEC 17025:2005.
 - (7) IOC/T.20/Dok. Nr. 14.
 - (8) IOC/T.20/Dok. Nr. 15.
 - (9) ISO/IEC 17025:05.“
-

ANHANG VI

„ANHANG XXa

METHODE ZUM NACHWEIS VON FREMDÖLEN IN OLIVENÖLEN

1. ANWENDUNGSBEREICH

Diese Methode dient dem Nachweis fremder Pflanzenöle in Olivenölen. In Olivenöl lassen sich Pflanzenöle mit hohem Linolsäuregehalt (Soja-, Raps-, Sonnenblumenöl usw.) sowie einige Pflanzenöle mit hohem Ölsäuregehalt (wie Haselnussöl, Sonnenblumenöl mit hohem Ölsäuregehalt und Oliventresteröl) nachweisen. Der Nachweisgrad hängt von der Art des Fremddöls und der Olivensorte ab. Bei Haselnussöl ist ein Nachweisgrad von 5–15 % üblich. Die Methode ermöglicht es nicht, die Art des festgestellten Fremddöls zu ermitteln, sondern zeigt nur an, ob es sich um unverfälschtes Olivenöl handelt oder nicht.

2. PRINZIP

Das Öl wird durch Festphasenextraktion (SPE) an Kieselgelkartuschen gereinigt. Die Triacylglycerin- (TAG-) Zusammensetzung wird durch hochauflösende Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter Verwendung eines Brechungsindexdetektors und von Propionitril als mobiler Phase bestimmt. Aus dem gereinigten Öl werden durch Methylierung mit einer kalten Lösung von KOH in Methanol (Anhang X B) Fettsäuremethylester (FAME) zubereitet, die anschließend mittels Kapillar-Gaschromatographie mit hohen polaren Trennsäulen analysiert werden (Anhang X A). Ein Computerprogramm berechnet die theoretische Triacylglycerinzusammensetzung anhand der Fettsäurezusammensetzung unter der Annahme einer 1,3-Random-2-Random-Verteilung der Fettsäuren im Triacylglycerin, mit Einschränkungen für die gesättigten Fettsäuren in 2-Stellung. Die Berechnungsmethode stellt eine Abwandlung des in Anhang XVIII beschriebenen Verfahrens dar. Anhand der theoretischen und experimentellen Triacylglycerinzusammensetzungen (HPLC) werden mehrere mathematische Algorithmen berechnet, und die so erhaltenen Werte werden mit den in einer Datenbank erfassten Werten unverfälschter Olivenöle verglichen.

3. MATERIALIEN UND REAGENZIEN

3.1. **Reinigung des Öls**

3.1.1. 25-ml-Erlenmeyerkolben, und Deckel mit PTFE-Dichtung.

3.1.3. Kieselgelkartuschen, 1 g (6 ml), für die Festphasenextraktion (z. B., Waters, Massachusetts, USA).

3.1.4. *n*-Hexan, Analysequalität.

3.1.5. Lösungsmittelgemisch aus Hexan/Diethylether (87:13, V/V).

3.1.6. *n*-Heptan, Analysequalität.

3.1.7. Aceton, Analysequalität.

3.2. **HPLC-Analyse der Triacylglycerine**

3.2.1. Mikroliterspritzen (50 µL) und Nadeln für die HPLC-Injektion.

3.2.2. Propionitril, reinst oder HPLC-Qualität (z. B. ROMIL, Cambridge, Vereinigtes Königreich) zur Verwendung als mobile Phase.

3.2.3. HPLC-Säule (25 cm × 4 mm Innendurchmesser), gepackt mit RP-18-Phase (Korngröße 4 µ).

3.3. **Zubereitung von Fettsäuremethylestern**

(Siehe Anhang X B)

3.3.1. Methanol mit höchstens 0,5 % Wassergehalt.

3.3.2. Heptan, Analysequalität.

3.3.3. Eine 2N-Lösung von Kaliumhydroxid in Methanol. 1,1 g Kaliumhydroxid werden in 10 ml Methanol gelöst.

3.3.4. 5-ml-Reagenzgläser mit Schraubverschluss und Deckel mit PTFE-Dichtung.

3.4. **Gaschromatische Analyse der FAME**

(Siehe Methode zur Bestimmung von ungesättigten *trans*-Fettsäuren mittels Kapillar-Gaschromatographie in Anhang X A).

3.4.1. Mikroliterspritzen (50 µL) und Nadeln für die GC-Injektion.

3.4.2. Wasserstoff oder Helium als Trägergas.

- 3.4.3 Wasserstoff und Sauerstoff für den Flammenionisationsdetektor.
- 3.4.4 Stickstoff oder Helium als Hilfsträgergas.
- 3.4.5. Fused Silica-Kapillarsäule (50-60 m × 0,25 – 0,30 mm Innendurchmesser), beschichtet mit Cyanopropylpolysiloxan- oder Cyanopropylphenylsiloxanphasen (SP-2380 oder ähnlich) mit 0,20-0,25 µm Schichtdicke.
- 4. GERÄTE
- 4.1. Vakuumgerät für Festphasenextraktion.
- 4.2. Rotationsverdampfer.
- 4.3. HPLC-Apparatur, bestehend aus:
 - 4.3.1. Entgaser für die mobile Phase.
 - 4.3.2. Rheodyn-Injektionsventil mit 10 µL-Schleife.
 - 4.3.3. Hochdruckpumpeneinheit.
 - 4.3.4. Thermostatisch regulierter Trockenschrank für die HPLC-Säule, einstellbar auf Temperaturen unterhalb der Umgebungstemperatur (15-20 °C) (z. B. Typ Peltier).
 - 4.3.5. Brechungsindexdetektor.
 - 4.3.6. Computergestütztes Datenerfassungssystem mit Integrationsprogramm.
- 4.4 Apparatur für Kapillargaschromatographie gemäß Anhang X A mit folgendem Zubehör:
 - 4.4.1. Split-Injektor.
 - 4.4.2. Flammenionisationsdetektor.
 - 4.4.3. Ofen mit programmierbarer Temperatur.
 - 4.4.4. Computergestütztes Datenerfassungssystem mit Integrationsprogramm.
- 4.5. Computer mit Microsoft EXCEL.

5. DURCHFÜHRUNG DER ANALYSE

5.1. Reinigung des Öls

Eine SPE-Kieselgelkartusche in einen Vakuum-Eluator geben und unter Vakuum mit 6 ml Hexan waschen. Das Vakuum unterbrechen, damit die Säule nicht austrocknet, und einen Erlenmeyerkolben unter die Kartusche stellen. In die Säule eine Lösung von etwa 0,12 g Öl in 0,5 ml Hexan geben, die Lösung durch das Kieselgel geben und dann mit 10 ml Lösungsgemisch (3.1.5) aus Hexan-Diethylether (87:13 v/v) unter Vakuum eluieren. Das eluierte Lösungsmittel homogenisieren und ungefähr die Hälfte der Menge in einen anderen Erlenmeyerkolben gießen. Beide Lösungen getrennt voneinander in einem Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck bei Zimmertemperatur bis zur Trocknung abrotieren. Zur Triacylglycerin-Analyse einen der Rückstände in 1 ml Aceton lösen (siehe Nummer 5.2 erster Absatz) und in ein 5-ml-Reagenzglas mit Schraubverschluss geben. Zur Zubereitung der Fettsäuremethylester den anderen Rückstand in 1 ml *n*-Heptan lösen und in ein zweites 5-ml-Reagenzglas mit Schraubdeckel geben.

Anmerkung: Das Öl kann über einer Kieselgelsäule nach der Methode IUPAC 2.507 gereinigt werden.

5.2. HPLC-Analyse der Triacylglycerine

Das HPLC-System einrichten, die Säulentemperatur bei 20 °C halten; als mobile Phase dient Propionitril bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 0,6 ml/min. Wenn die Basislinie stabil ist, eine Lösungsmittelinjektion durchlaufen lassen; wenn die Basislinie im Bereich 12 bis 25 min unruhig erscheint, die Probe mit einer anderen Art von Aceton oder einer Mischung aus Propionitril/Aceton (25:75) lösen.

Anmerkung: Einige Arten von Aceton rufen Störungen der Basislinie in der genannten Region hervor.

Ein 10-µl-Aliquot der Lösung aus gereinigtem Öl in Aceton (5 %) einspritzen. Der Durchlauf dauert ca. 60 min. Ofentemperatur und/oder Durchlaufgeschwindigkeit sind so anzupassen, dass das Chromatogramm dem in Abbildung 1 ähnelt, wo Trilinolein (Peak 1) bei 15,5 min eluiert und die Auflösungen zwischen den Paaren LLL/OLLn (Peaks 1 und 2) und OLL/OOLn (Peaks 4 und 5) gut sind.

Die Höhe von Peak 2 (OLLn+PoLL) muss zumindest 3 % des vollen Skalenendwerts erreichen.

5.3. Zubereitung der Fettsäuremethylester

0,1 ml einer 2N-Lösung aus Kaliumhydroxid in Methanol zu der Lösung aus gereinigtem Öl in 1 ml *n*-Heptan hinzugeben. Deckel fest auf das Reagenzglas schrauben. Das Glas 15 Sekunden kräftig schütteln und absetzen lassen, bis sich die obere Schicht geklärt hat (5 Minuten). Die *n*-Heptan-Lösung ist bereit zur Injektion in den Gaschromatographen. Die Lösung kann höchstens 12 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

5.4. GC-Analyse der Fettsäuremethylester

Es ist das Verfahren anzuwenden, das im Rahmen der Methode zur Bestimmung von *trans*-Fettsäuren beschrieben wurde (siehe Anhang X A).

Das GC-System einrichten und auf eine Ofentemperatur von 165 °C einstellen. Empfohlen wird eine isotherme Ofentemperatur von 165 °C für 10 min, danach Aufheizen um 1,5 °C/min bis auf 200 °C. Für das Einspritzsystem wird eine Temperatur zwischen 220 °C und 250 °C empfohlen, um die Bildung von *trans*-Fettsäuren möglichst gering zu halten (siehe Anhang X A). Detektortemperatur: 250 °C. Als Trägergas ist Wasserstoff oder Helium bei einem Säulenkopfdruck von ca. 130 kPa zu verwenden. Injektionsvolumen: 1 µL im Split-Injektionsmodus.

Es muss ein ähnliches GC-Profil wie in Abbildung 2 erreicht werden. Besonders ist auf die Auflösung zwischen C18:3 und C20:1 zu achten (der C18:3-Peak muss vor dem C20:1-Peak erscheinen). Um diese Bedingungen zu erfüllen, muss die Anfangstemperatur und/oder die Säulenkopftemperatur optimiert werden. Das Einspritzsystem ist so einzustellen (Temperatur, Splitverhältnis und Volumeninjektion), dass die Unterscheidung von Palmitin- und Palmitoleinsäure weitestgehend vermieden wird.

Die Höhe des C20:0-Peaks muss etwa 20 % des vollen Skalenendwerts betragen, um die Quantifizierung der *trans*-Isomere zu ermöglichen. Erscheint der C18:0-Peak verzerrt, ist die Probenmenge zu verringern.

6. INTEGRATION CHROMATOGRAPHISCHER PEAKS

6.1. HPLC-Chromatogramm

Abbildung 1 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm der Triacylglycerine eines gereinigten Olivenöls. Zur Integration der Peaks müssen drei Basislinien gezogen werden: die erste zwischen dem Beginn von Peak 1 und dem Ende von Peak 3; die zweite zwischen dem Beginn von Peak 4 und dem Tal vor Peak 8; die dritte zwischen dem Tal vor Peak 8 und dem Ende von Peak 18.

Die Gesamtfläche ist die Summe der Flächen aller (identifizierten und nicht identifizierten) Peaks von Peak 1 bis Peak 18. Der prozentuale Anteil jedes Peaks ergibt sich aus der Formel

$$\text{TAG}_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

Die prozentualen Anteile sind mit zwei Dezimalstellen anzugeben.

6.2. Gaschromatogramm

Abbildung 2 zeigt ein Gaschromatogramm von Fettsäurealkylestern, die aus einem gereinigten Olivenöl gewonnen wurden. Zu berechnen sind die prozentualen Anteile folgender Fettsäuren:

Palmitinsäure;	P (C16:0)	=	Methylester + Ethylester
Stearinsäure;	S (C18:0)	=	Methylester
Palmitolsäure;	Po (C16:1)	=	Summe der Methylester der beiden <i>cis</i> -Isomere
Ölsäure;	O (C18:1)	=	Summe der Methylester der beiden <i>cis</i> -Isomere + Ethylester + <i>trans</i> -Isomere
Linolsäure;	L (C18:2)	=	Methylester + Ethylester + <i>trans</i> -Isomere
Linolensäure;	Ln (C18:3)	=	Methylester + <i>trans</i> -Isomere
Arachinsäure;	A (C20:0)	=	Methylester
Eicosensäure (Gadol- einsäure);	G (C20:1)	=	Methylester

Ethyl- und *trans*-Isomer-Ester können im Gaschromatogramm fehlen.

Die Gesamtfläche (AT) ist die Summe aller im Chromatogramm erscheinenden Peaks von C14:0 bis C24:0 mit Ausnahme dessen, der Squalen entspricht. Der prozentuale Anteil jedes einzelnen Peaks wird wie folgt berechnet:

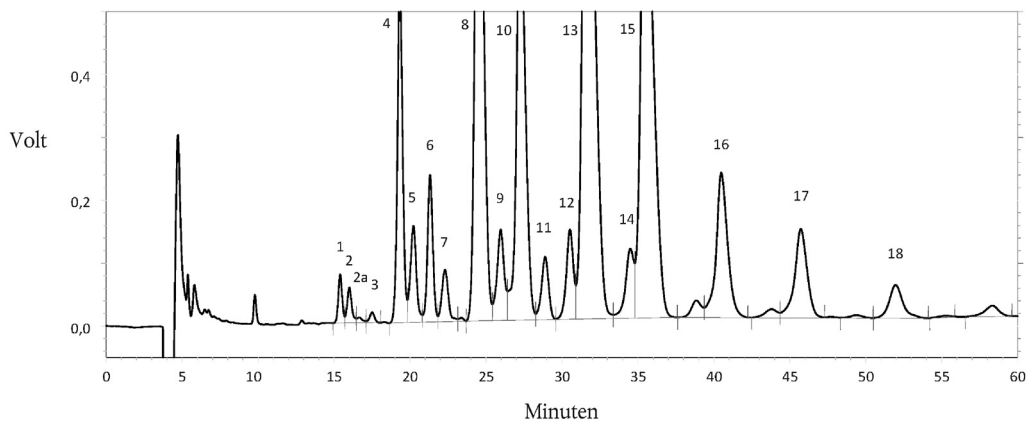
$$\text{FA}_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

Die Ergebnisse werden mit zwei Dezimalstellen angegeben.

Bei den mittels Computerprogramm vorgenommenen Berechnungen erübrigt sich die Normalisierung auf 100, weil sie automatisch vorgenommen wird.

Abbildung 1

HPLC-Chromatogramm der TAG in einem nativem Olivenöl aus „Chemlali“-Oliven. Hauptkomponenten der Peaks



- (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; (4) OLL; (5) OOLn+PoOL;
 (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; (8) OOL+LnPP; (9) PoOO;
 (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP;
 (13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; (17) SOO;
 (18) POS+SLS.

Tabelle 1

Daten zur Wiederholbarkeit der Bestimmung von TAG in nativem Olivenöl mittels HPLC bei einer Säulentemperatur von 20 °C mit Propionitril als mobiler Phase

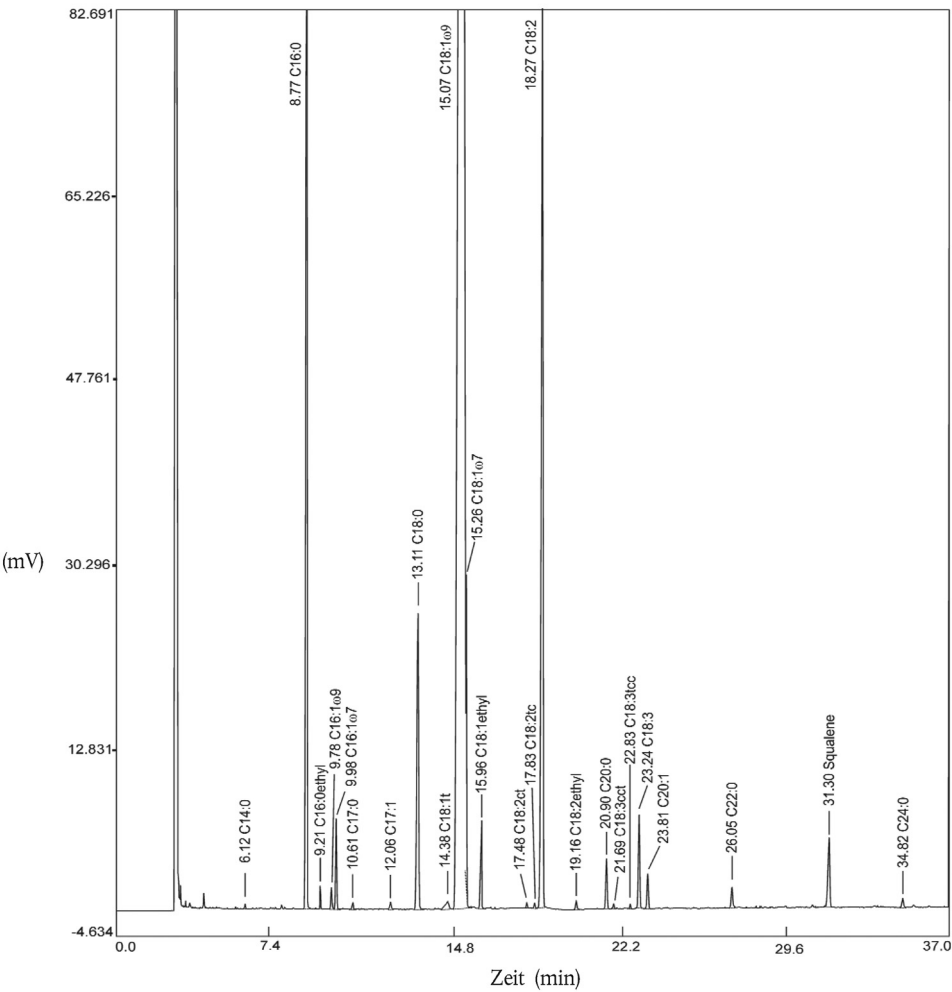
ECN	HPLC-Peaks	TAG	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Probe 4		Probe 5	
			Mittel (%)	RSD _r (%)	Mittel (%)	RSD _r (%)	Mittel (%)	RSD _r (%)	Mittel (%)	RSD _r (%)	Mittel (%)	RSD _r (%)
42	1	LLL	0,020	7,23	0,066	5,18	0,095	4,10	0,113	0,95	0,34	1,05
	2	OLLn+ PoLL	0,085	7,44	0,24	1,78	0,26	2,25	0,35	2,02	0,50	2,83
	3	PLLn	0,023	15,74	0,039	5,51	0,057	5,62	0,082	4,35	0,12	6,15
44	4	OLL	0,47	1,52	1,53	0,42	2,62	0,98	3,35	1,05	4,37	1,13
	5	OOLn+ PoOL	1,07	2,01	1,54	0,46	1,61	0,71	1,72	1,07	1,77	2,40
	6	PLL+ PoPoO	0,11	12,86	0,24	4,37	0,65	1,32	1,35	0,73	2,28	1,24
	7	POLn+ Ppo-Po+ PpoL	0,42	5,11	0,49	2,89	0,55	2,01	0,85	1,83	1,09	1,96
46	8	OOL+ LnPP	6,72	0,63	8,79	0,31	11,21	0,42	13,25	0,33	15,24	0,23
	9	PoOO	1,24	2,86	1,49	0,95	1,63	0,85	2,12	0,45	2,52	0,56
	10	SLL+ PLO	2,70	0,65	4,05	0,70	6,02	0,65	9,86	0,53	11,53	0,31
	11	PoOP+ SPoL+ SOLn+ SPoPo	0,64	4,42	0,69	3,02	0,79	1,23	1,53	0,89	1,70	1,66

ECN	HPLC-Peaks	TAG	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Probe 4		Probe 5	
			Mittel (%)	RSD _r (%)	Mittel (%)	RSD _r (%)	Mittel (%)	RSD _r (%)	Mittel (%)	RSD _r (%)	Mittel (%)	RSD _r (%)
48	12+13	OOO+ PLP+ PoPP	49,60	0,07	48,15	0,06	42,93	0,06	33,25	0,10	24,16	0,06
	14	SOL	0,82	1,72	0,92	1,56	1,05	1,32	1,25	1,05	1,60	1,77
	15	POO	22,75	0,25	21,80	0,20	21,05	0,30	20,36	0,35	20,17	0,14
50	16	POP	3,05	0,46	4,56	0,42	4,98	0,52	5,26	0,41	5,57	0,38
	17	SOO	6,87	0,21	5,56	0,33	4,86	0,43	4,12	0,72	3,09	0,69
	18	POS+ SLS	1,73	1,23	1,65	1,10	1,54	0,99	1,49	1,10	1,41	1,00

n = 3 Wiederholungen
RSD_r = Relative Standardabweichung der Wiederholbarkeit

Abbildung 2

Gas - Chromatogramm von Fettsäurealkylestern, die aus einem Oliventresteröl durch Ummesterung mit einer kalten Lösung von KOH in Methanol gewonnen wurden



7. NACHWEIS VON FREMDÖLEN IN OLIVENÖLEN

Die Berechnungsmethode für den Nachweis von Fremddölen in Olivenölen, die auf einem Vergleich mathematischer Algorithmen mit den in einer Datenbank erfassten Werten unverfälschter Olivenöle beruht, wird in Anhang I des Standards IOC/T.20/Dok. Nr. 25 beschrieben.“
