

DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) 2019/1604 DER KOMMISSION**vom 27. September 2019****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 (EU) Nr. 1308/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. Dezember 2013 über eine gemeinsame Marktorganisation für landwirtschaftliche Erzeugnisse und zur Aufhebung der Verordnungen (EWG) Nr. 922/72, (EWG) Nr. 234/79, (EG) Nr. 1037/2001 und (EG) Nr. 1234/2007 des Rates ⁽¹⁾, insbesondere auf Artikel 91 Absatz 1 Buchstabe d,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) In der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 der Kommission ⁽²⁾ sind die physikalisch-chemischen und organoleptischen Merkmale von Olivenöl und Oliventresteröl sowie Verfahren zur Beurteilung dieser Merkmale festgelegt.
- (2) Die Verfahren und Grenzwerte für die Merkmale von Ölen werden auf der Grundlage der Stellungnahmen von Chemiesachverständigen und in Übereinstimmung mit den Arbeiten des Internationalen Olivenrates (im Folgenden „IOR“) regelmäßig aktualisiert.
- (3) Um die Umsetzung der jüngsten vom IOR aufgestellten internationalen Normen auf Unionsebene zu gewährleisten, sollten bestimmte Analyseverfahren, die in der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 festgelegt sind, aktualisiert werden.
- (4) Der IOR-Vermarktungsstandard wurde aus Gründen der Konsistenz mit den Präzisionswerten der Analysemethoden hinsichtlich der Bestimmung des Grenzwerts für freie Säure und Peroxide sowie der organoleptischen Bewertung (Median der Mängel und Median des Attributs „fruchtig“) und der ECN42-Differenz zwischen HPLC-Messwert und theoretischer Berechnung geändert.
- (5) Gemäß Artikel 2a Absatz 5 der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 prüfen die Mitgliedstaaten, ob eine Olivenölprobe der deklarierten Kategorie entspricht, indem sie die in Anhang I der Verordnung festgelegten Merkmale entweder in beliebiger Reihenfolge oder nach der Reihenfolge des schematisierten Entscheidungsablaufs gemäß Anhangs Ib der Verordnung überprüfen.
- (6) Angesichts der jüngsten Entwicklungen sollten die Tabellen in Anhang Ib der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 und gegebenenfalls dessen Anlage aktualisiert werden. Zudem scheint der Begriff „Ablaufdiagramm“ angesichts des Inhalts des Anhangs Ib angemessener als der Begriff „schematisierter Entscheidungsablauf“.
- (7) In Anhang XII Nummer 9.4 der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 ist der Median der Mängel als der Median des mit der stärksten Intensität wahrgenommenen Mangels definiert. Im Zusammenhang mit Gegenanalysen und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass verschiedene Prüfergruppen die Konformität des Öls bewerten müssen, sollte klargestellt werden, dass sich die Entscheidung über die Konformität der Merkmale eines Öls mit der deklarierten Kategorie ausschließlich auf den Wert des Medians des Hauptfehlers, unabhängig von dessen Art, bezieht.
- (8) Die Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 sollte daher entsprechend geändert werden.
- (9) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ausschusses 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 wird wie folgt geändert:

a) Absatz 1 Buchstabe l erhält folgende Fassung:

„l) Zusammensetzung von und Gehalt an Sterinen und Gehalt an alkoholischen Verbindungen durch Kapillar-Gaschromatografie nach dem Verfahren des Anhangs XIX;“

⁽¹⁾ ABl. L 347 vom 20.12.2013, S. 671.

⁽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).

b) Absatz 2 Unterabsatz 3 erhält folgende Fassung:

„Bestätigt die Prüfergruppe die organoleptischen Merkmale der deklarierten Olivenölkategorie nicht, so fordern die einzelstaatlichen Behörden oder ihre Vertreter auf Antrag des Betroffenen unverzüglich zwei Gegenanalysen anderer zugelassener Prüfergruppen an. Mindestens eine der Prüfergruppen muss von dem betreffenden Erzeugermitgliedstaat zugelassen worden sein. Die fraglichen Merkmale gelten als mit den deklarierten Merkmalen konform, wenn die zwei Gegenanalysen die deklarierte Einstufung bestätigen. Ist dies nicht der Fall, wird die Einstufung unabhängig von der Art der bei den Gegenanalysen festgestellten Mängel als unvereinbar mit den Merkmalen erklärt und die Betroffenen tragen die Kosten der Gegenanalysen.“

2. Artikel 2a Absatz 5 Buchstabe b erhält folgende Fassung:

„b) nach der Reihenfolge des Anhangs Ib über das Ablaufdiagramm, bis eine der in diesem Diagramm vorgesehenen Entscheidungen erreicht ist.“

3. Die Tabelle „ANHÄNGE Inhalt“ wird durch die Tabelle in Anhang I der vorliegenden Verordnung ersetzt.

4. Anhang I erhält die Fassung von Anhang II der vorliegenden Verordnung.

5. Anhang Ia Nummer 2.1 erhält folgende Fassung:

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

6. Anhang Ib erhält die Fassung von Anhang III der vorliegenden Verordnung.

7. Anhang V wird gestrichen.

8. Anhang VII Nummer 4.2 erhält folgende Fassung:

„4.2. n-Hexan (für die Chromatografie). Hexan kann durch Isooctan (2,2,4-Trimethylpentan für die Chromatografie) ersetzt werden, sofern vergleichbare Präzisionswerte erreicht werden.“

9. Anhang XII wird gemäß Anhang IV der vorliegenden Verordnung geändert.

10. Anhang XVII wird gemäß Anhang V der vorliegenden Verordnung geändert.

11. Anhang XVIII wird gemäß Anhang VI der vorliegenden Verordnung geändert.

12. Anhang XIX erhält die Fassung von Anhang VII der vorliegenden Verordnung.

13. Anhang XX Nummer 4.2 erhält folgende Fassung:

„4.2. n-Hexan, für die Chromatografie oder Rückstandsanalyse. Hexan kann durch Isooctan (2,2,4-Trimethylpentan für die Chromatografie) ersetzt werden, sofern vergleichbare Präzisionswerte erreicht werden. Lösungsmittel mit einem höheren Siedepunkt als n-Hexan verdunsten langsamer. Allerdings sind sie aufgrund der Toxizität von Hexan zu bevorzugen. Die Reinheit muss überprüft werden; so kann etwa der Rückstand nach der Verdampfung von 100 ml Lösungsmittel kontrolliert werden.“

ACHTUNG — Die Dämpfe können sich entzünden. Von Wärmequellen, Funken oder offenem Feuer fernhalten. Die Flaschen müssen immer fest verschlossen sein. Bei der Verwendung ist für ausreichende Belüftung zu sorgen. Entstehung von Dämpfen verhindern und alle möglichen Geräte, von denen ein Brandrisiko ausgehen kann, z. B. nicht aus nicht entflammaren Werkstoffen hergestellte Heizgeräte oder elektrische Geräte, entfernen. Schädlich beim Einatmen, da Nervenzellen geschädigt werden können. Dämpfe nicht einatmen. Erforderlichenfalls ein geeignetes Atemschutzgerät benutzen. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.

Isooctan ist eine entzündbare Flüssigkeit, die eine Brandgefahr darstellt. Explosionsgrenzen in der Luft liegen zwischen 1,1 % und 6,0 % (Volumenanteil). Es ist sowohl beim Verschlucken als auch beim Einatmen toxisch. Verwenden Sie einen voll funktionstüchtigen Abzug, wenn Sie mit diesem Lösungsmittel arbeiten.“

Artikel 2

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

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

Brüssel, den 27. September 2019

Für die Kommission

Der Präsident

Jean-Claude JUNCKER

ANHANG I

„ANHÄNGE

INHALT

Anhang I	Merkmale von Olivenölen
Anhang Ia	Probenahme bei Olivenöl oder Oliventresteröl, das in unmittelbaren Verpackungseinheiten geliefert wird
Anhang Ib	Ablaufdiagramm für die Prüfung der Konformität einer Olivenölprobe mit der deklarierten Kategorie
Anhang II	Bestimmung der freien Fettsäuren, Kaltverfahren
Anhang III	Bestimmung der Peroxidzahl
Anhang IV	Kapillargaschromatografische Bestimmung des Wachsgehalts
Anhang VII	Bestimmung des prozentualen Gehalts an 2-Glycerinmonopalmitat
Anhang IX	UV-spektrophotometrische Analyse
Anhang X	Bestimmung des Gehalts an Fettsäuremethylestern durch Gaschromatografie
Anhang XI	Bestimmung des Gehalts an flüchtigen halogenierten Lösungsmitteln in Olivenöl
Anhang XII	Verfahren des internationalen Olivenölrates für die organoleptische Prüfung von nativen Olivenölen
Anhang XV	Ölgehalt der Oliventrester
Anhang XVI	Bestimmung der Iodzahl
Anhang XVII	Methode zur Bestimmung von Stigmastadienen in pflanzlichen Ölen
Anhang XVIII	Bestimmung der Differenz zwischen dem tatsächlichen und dem theoretischen Gehalt an Triglyceriden mit ECN 42
Anhang XIX	Bestimmung der Zusammensetzung von und des Gehalts an Sterinen und des Gehalts an alkoholischen Verbindungen durch Kapillar-Gaschromatografie
Anhang XX	Verfahren für die Bestimmung des Gehalts an Wachsen, Fettsäuremethylestern und Fettsäureethylestern durch Kapillar-Gaschromatografie
Anhang XXI	Ergebnisse der durchgeführten Konformitätskontrollen von Olivenölen gemäß Artikel 8 Absatz 2“

ANHANG II

„ANHANG I

MERKMALE VON OLIVENÖLEN

Qualitätsmerkmale

Kategorie	Säuregehalt (%) (*)	Peroxidzahl (meq O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₆₈ oder K ₂₇₀	Delta-K	Sensorische Prüfung		Fettsäureethyles- ter (mg/kg)
						Fehlermedian (Md) (*)	Fruchtigkeitsme- dian (Mf)	
1. Natives Olivenöl extra	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Natives Olivenöl	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Lampantöl	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 ⁽¹⁾	—	—
4. Raffiniertes Olivenöl	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Olivenöl — bestehend aus raffinierten Olivenölen und nativen Olivenölen	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Rohes Oliventresteröl	—	—	—	—	—		—	—
7. Raffiniertes Oliventresteröl	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Oliventresteröl	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

⁽¹⁾ Der Fehlermedian darf höchstens 3,5 betragen, wenn der Fruchtigkeitsmedian gleich 0,0 ist.

Reinheitsmerkmale

Kategorie	Zusammensetzung der Fettsäuren ⁽¹⁾						Summe transisomere Ölsäure (%)	Summe transisomere Linol- und Linolensäure (%)	Stigmastadiene (mg/kg) ⁽²⁾	ECN42-Differenz zwischen HPLC-Messwert und theoretischer Berechnung	2- Glycerinmonopalmitat (%)
	Myristinsäure (%)	Linolensäure (%)	Arachninsäure (%)	Eicosensäure (%)	Behensäure (%)	Lignocensäure (%)					
1. Natives Olivenöl extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 wenn Gesamtgehalt an Palmitinsäure ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 wenn Gesamtgehalt an Palmitinsäure > 14,00 %
2. Natives Olivenöl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 wenn Gesamtgehalt an Palmitinsäure ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 wenn Gesamtgehalt an Palmitinsäure > 14,00 %
3. Lampantöl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,9 wenn Gesamtgehalt an Palmitinsäure ≤ 14,00 %
											≤ 1,1 wenn Gesamtgehalt an Palmitinsäure > 14,00 %
4. Raffiniertes Olivenöl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9 wenn Gesamtgehalt an Palmitinsäure ≤ 14,00 %
											≤ 1,1 wenn Gesamtgehalt an Palmitinsäure > 14,00 %
5. Olivenöl — bestehend aus raffinierten Olivenölen und nativen Olivenölen	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9 wenn Gesamtgehalt an Palmitinsäure ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 wenn Gesamtgehalt an Palmitinsäure > 14,00 %
6. Rohes Oliventresteröl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,60	≤ 1,4
7. Raffiniertes Oliventresteröl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,4
8. Oliventresteröl	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,2

⁽¹⁾ Gehalt an anderen Fettsäuren (%): Palmitinsäure: 7,50-20,00; Palmitoleinsäure: 0,30-3,50; Heptadecensäure: ≤ 0,40; Heptadecensäure: ≤ 0,60; Stearinsäure: 0,50-5,00; Ölsäure: 55,00- 83,00; Linolsäure: 2,50-21,00.

⁽²⁾ Summe der mittels Kapillarsäule (nicht) abtrennbaren Isomere.

Kategorie	Zusammensetzung der Sterine						Sterine insges. (mg/kg)	Erytrodiol und Uvaol (%) (**)	Wachse (mg/kg) (**)
	Cholesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol ⁽¹⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App. β -Sitosterol ⁽²⁾ (%)	Delta-7-Stigmasterol ⁽¹⁾ (%)			
1. Natives Olivenöl extra	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Natives Olivenöl	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Lampantöl	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$ ⁽³⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ ⁽³⁾
4. Raffiniertes Olivenöl	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Olivenöl — bestehend aus raffinierten Olivenölen und nativen Olivenölen	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Rohes Oliventresteröl	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 2\ 500$	$> 4,5$ ⁽⁴⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ ⁽⁴⁾
7. Raffiniertes Oliventresteröl	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 800$	$> 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Oliventresteröl	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 600$	$> 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

⁽¹⁾ Siehe die Anlage zu diesem Anhang.

⁽²⁾ App. β -Sitosterol: Delta-5,23-Stigmastadienol + Clerosterol + Beta-Sitosterol + Sitostanol + Delta-5-Avenasterol + Delta-5,24-Stigmastadienol.

⁽³⁾ 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 Erytrodiol und Uvaol höchstens 3,5 % beträgt.

⁽⁴⁾ 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 und der Gehalt an Erytrodiol und Uvaol über 3,5 % beträgt.

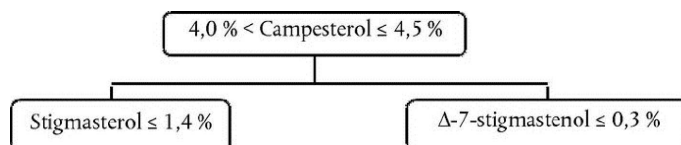
Anmerkungen:

- Die Analyseergebnisse müssen bis auf die gleiche Anzahl Dezimalstellen angegeben werden wie die für jedes Merkmal vorgesehenen Werte. Ist die nächstfolgende Ziffer größer als 4, so ist die angegebene letzte Stelle aufzurunden.
- Auch wenn nur ein einziges Merkmal nicht mit dem vorgesehenen Grenzwert übereinstimmt, muss das Öl einer anderen Kategorie zugeordnet werden oder als nicht konform im Sinne der vorliegenden Verordnung erklärt werden.
- Bei Lampantöl können beide mit einem Sternchen (*) versehenen Qualitätsmerkmale gleichzeitig von den für diese Kategorie festgelegten Grenzwerten abweichen.
- Die mit zwei Sternchen (**) gekennzeichneten Ölqualitätsmerkmale bedeuten im Fall roher Oliventresteröle, dass von den beiden betreffenden Grenzwerten gleichzeitig abgewichen werden kann. Bei Oliventresterölen und raffinierten Oliventresterölen kann von einem der betreffenden Grenzwerte abgewichen werden.

Anlage

Schematisierte Entscheidungsabläufe

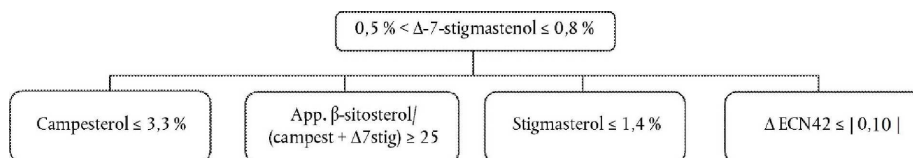
Entscheidungsablauf **Campesterol** für native Olivenöle und native Olivenöle extra:



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

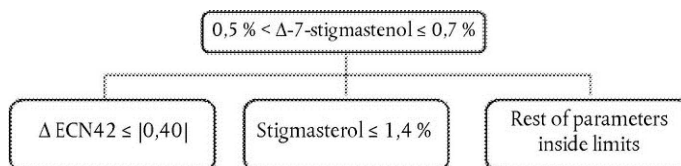
Entscheidungsablauf **Delta-7-Stigmasterol** für:

— Native Olivenöle extra und native Olivenöle



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

— Oliventresteröle (roh und raffiniert)



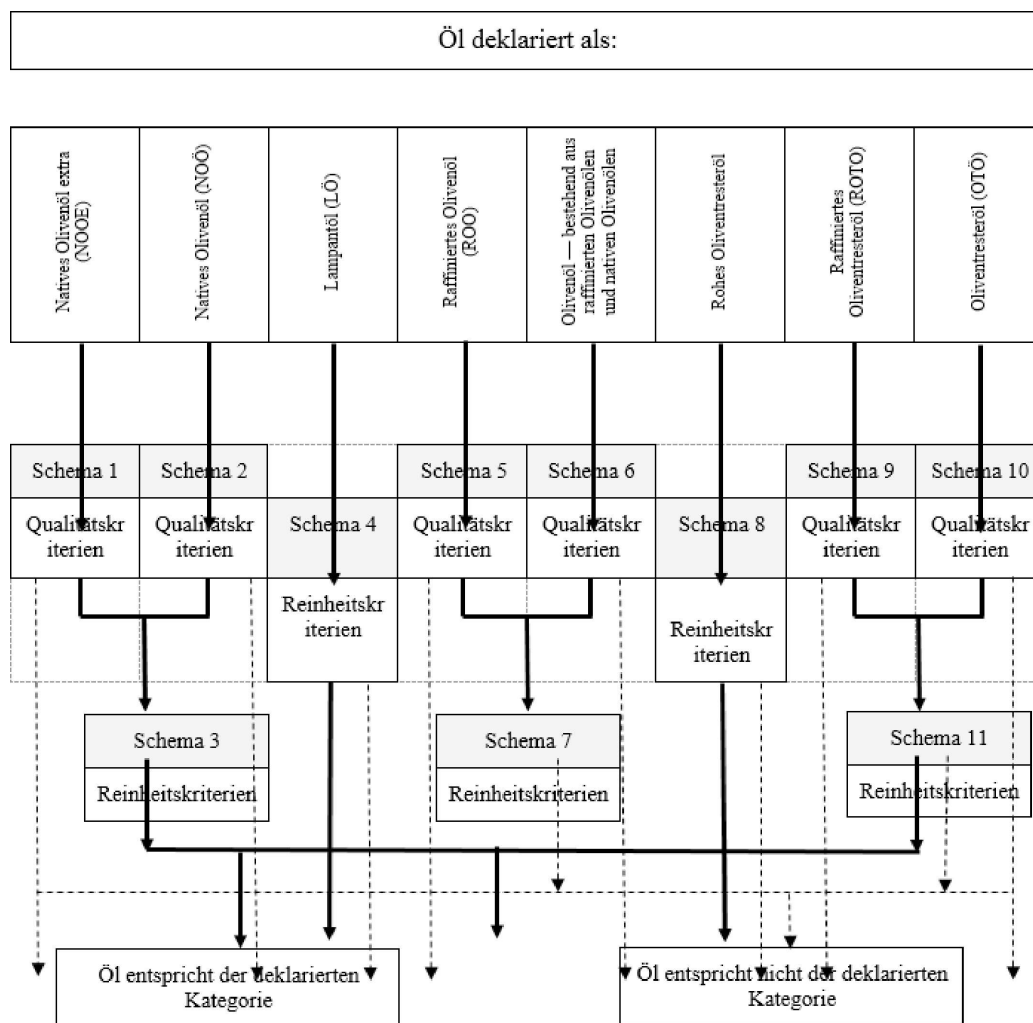
Die übrigen Parameter müssen die in dieser Verordnung festgelegten Grenzwerte einhalten.“

ANHANG III

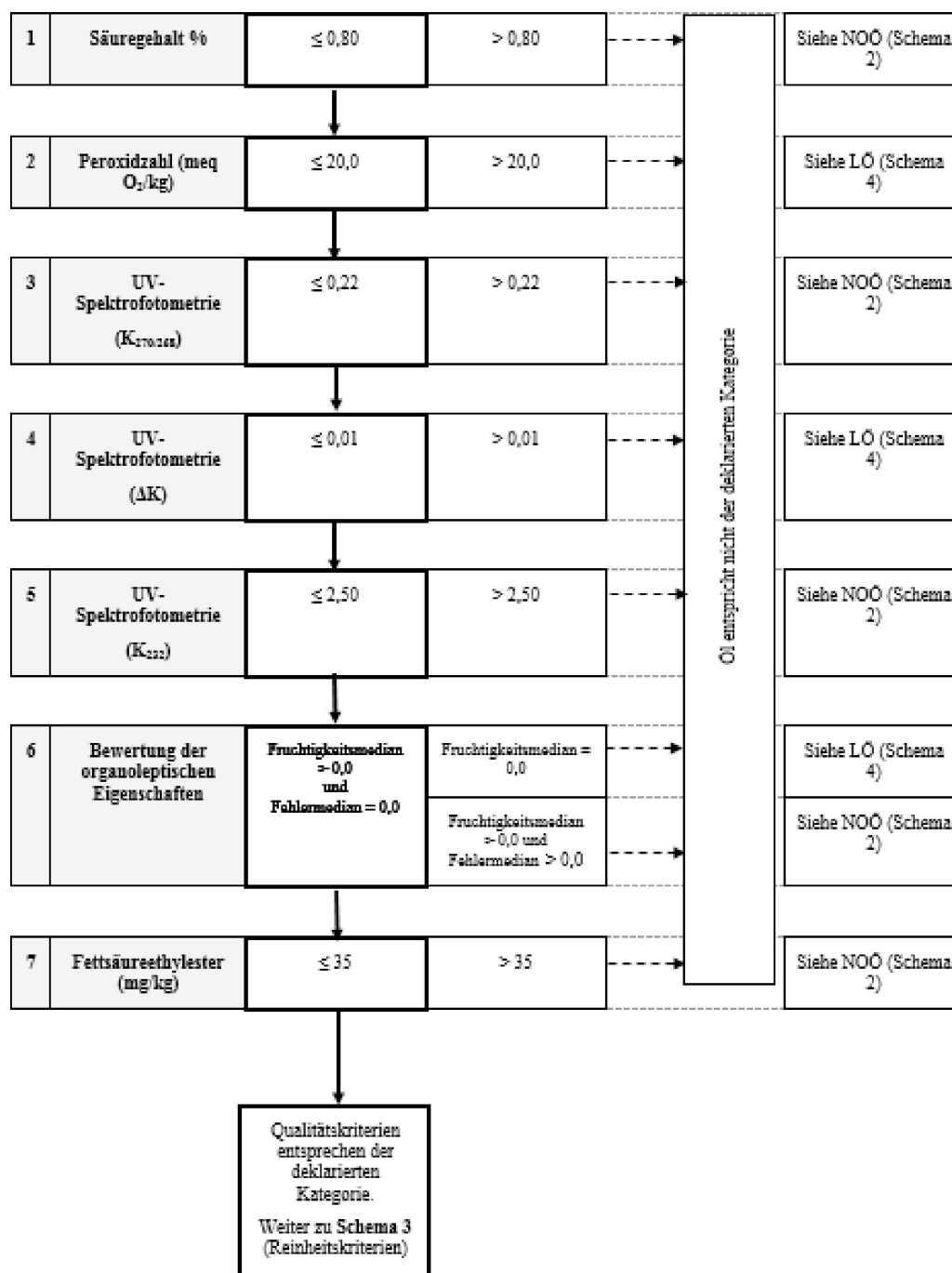
„ANHANG Ib

ABLAUFDIAGRAMM FÜR DIE PRÜFUNG DER KONFORMITÄT EINER OLIVENÖLPROBE MIT DER DEKLARIERTEN KATEGORIE

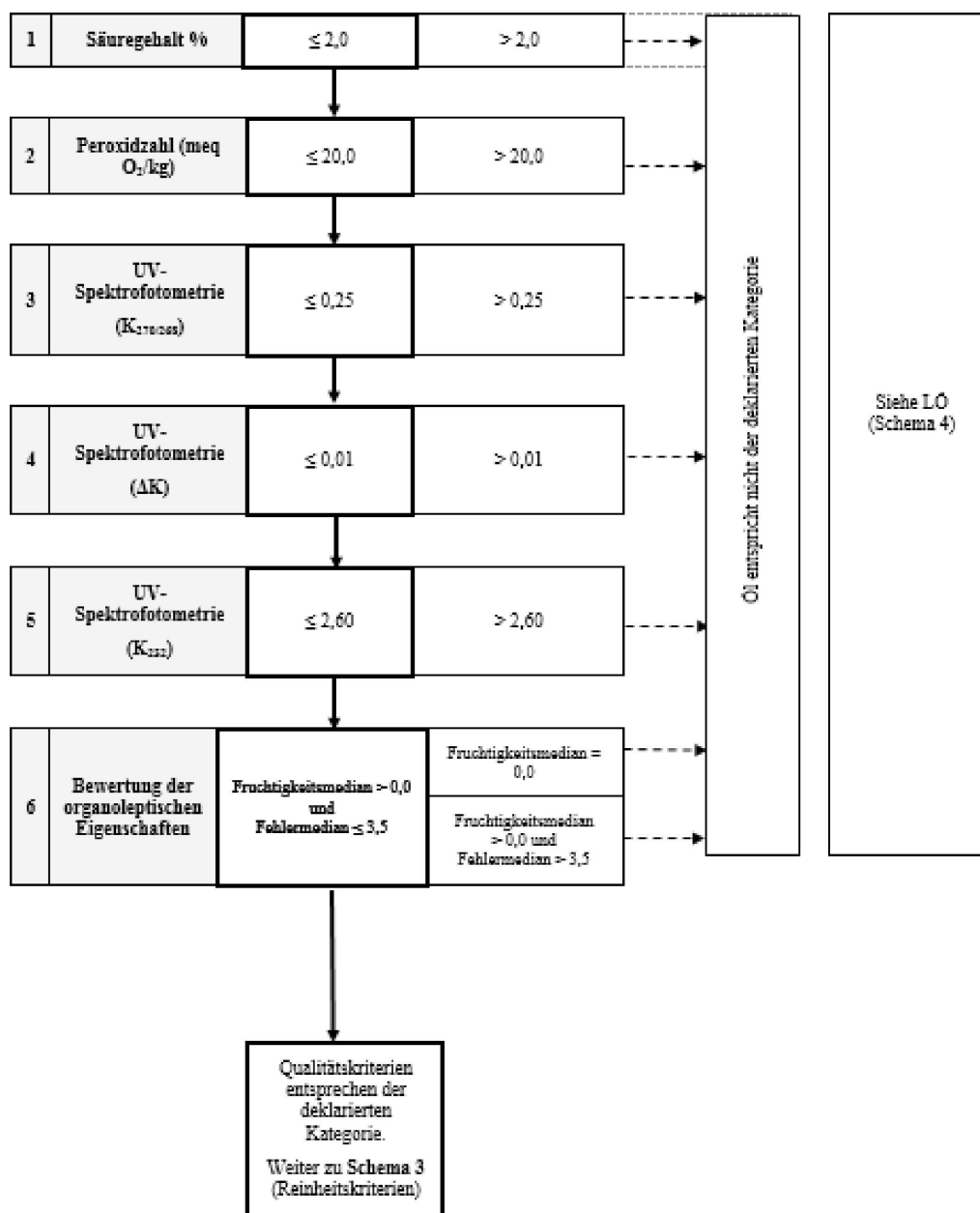
Allgemeines Schema



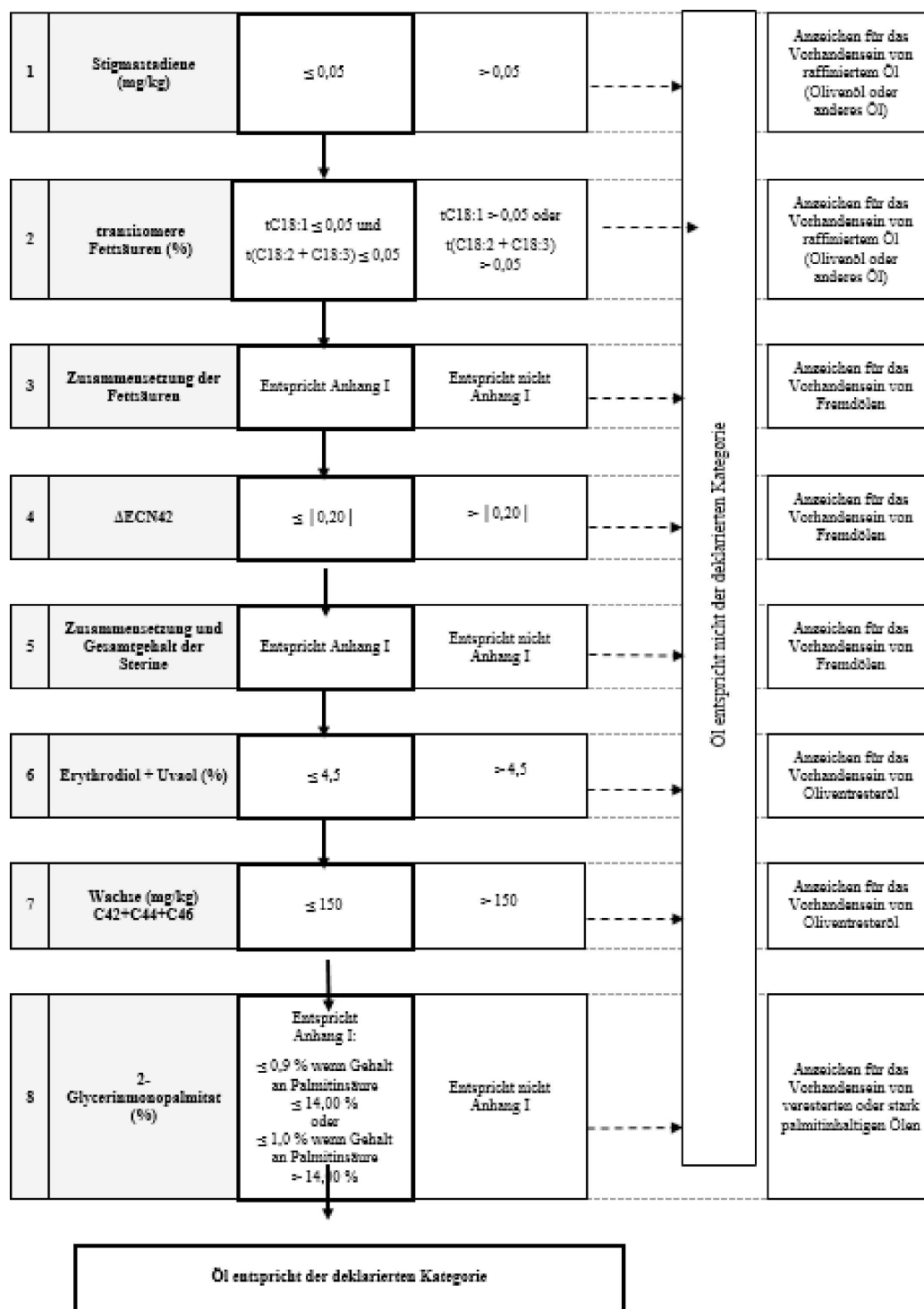
Schema 1 — Natives Olivenöl extra — Qualitätskriterien



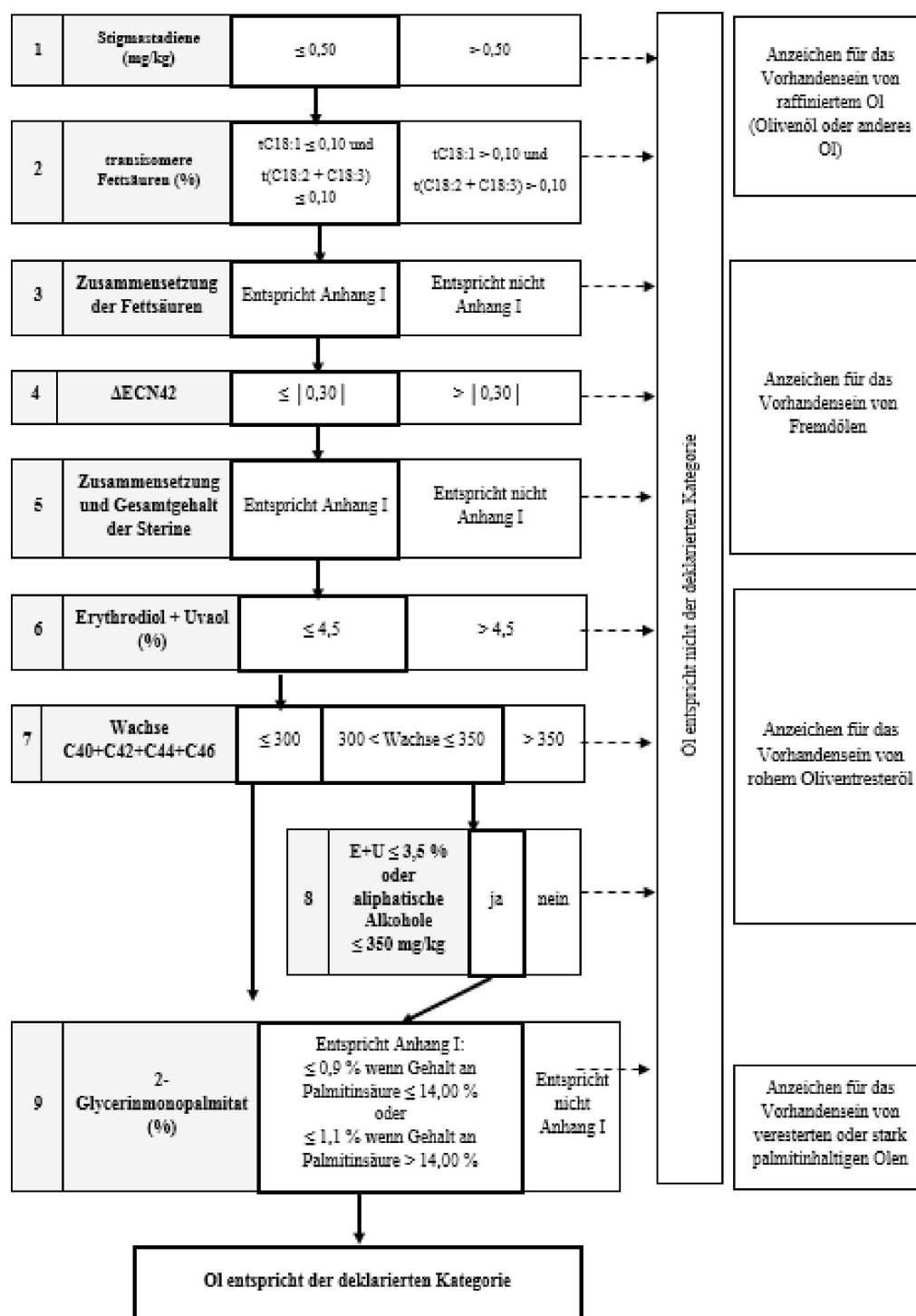
Schema 2 — Natives Olivenöl — Qualitätskriterien



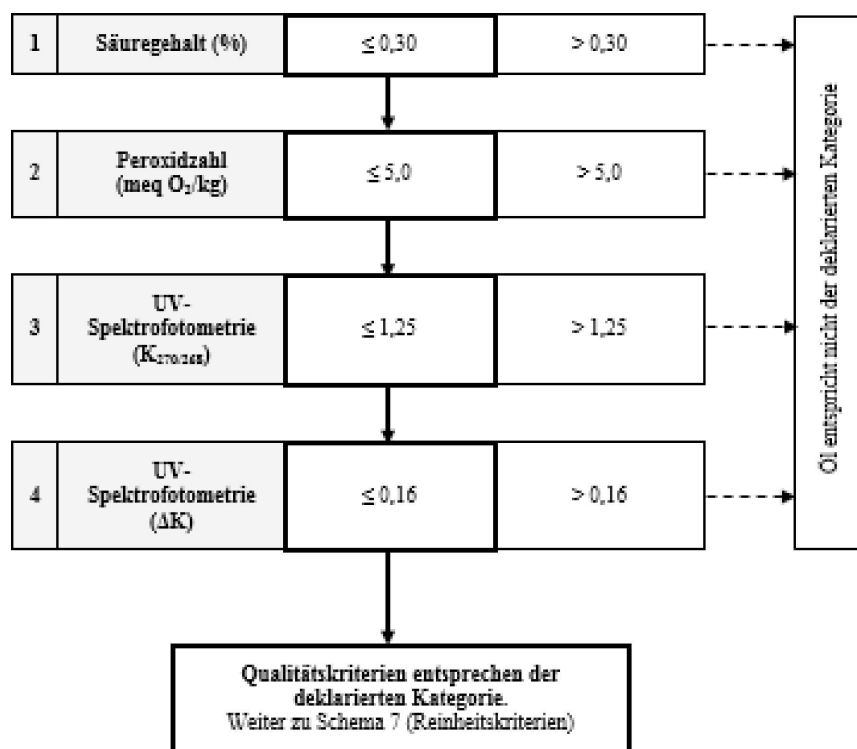
Schema 3 — Natives Olivenöl extra und natives Olivenöl — Reinheitskriterien



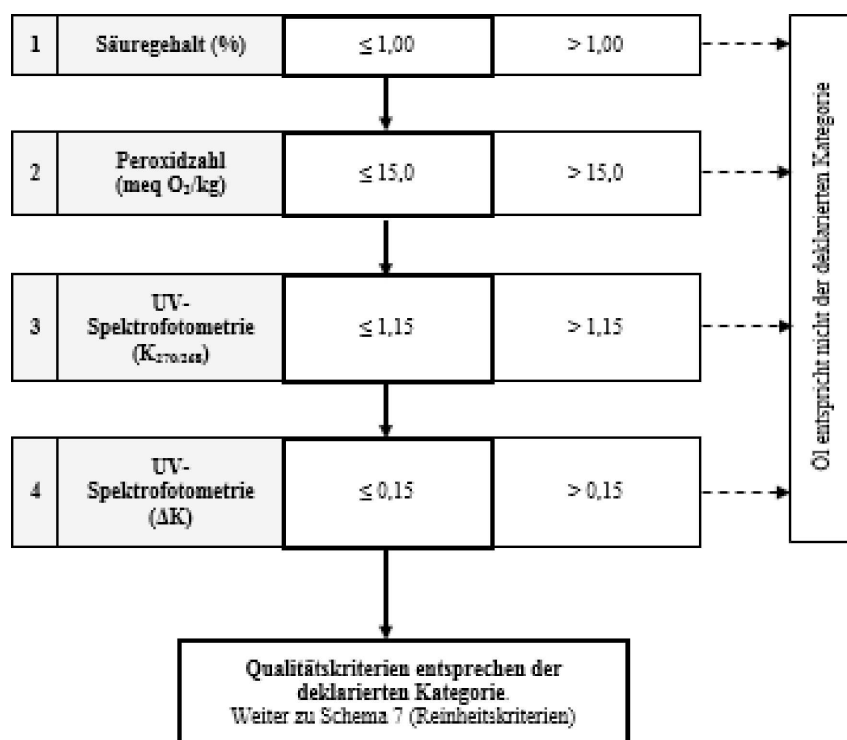
Schema 4 — Lampantöl — Reinheitskriterien



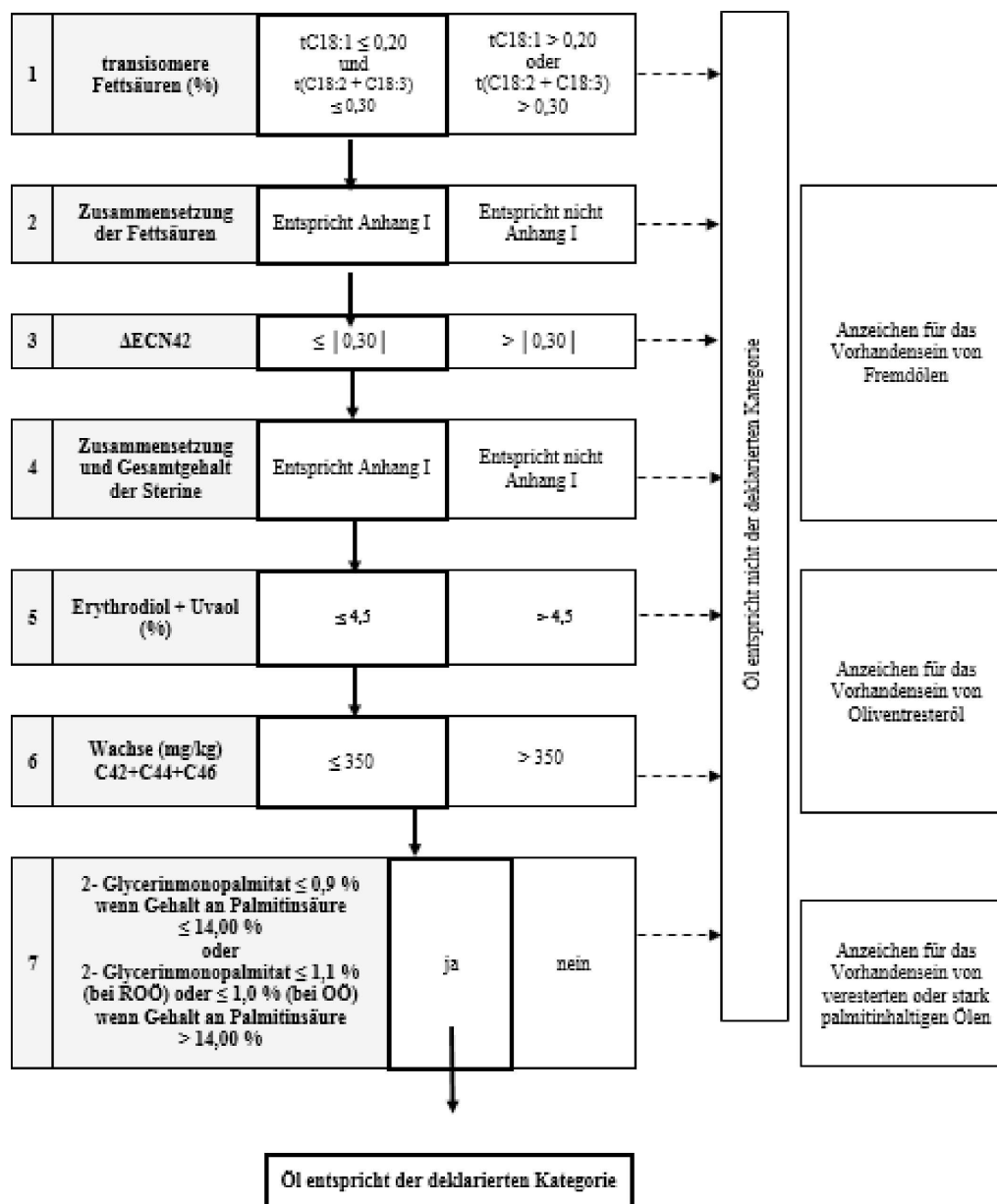
Schema 5 — Raffiniertes Olivenöl — Qualitätskriterien



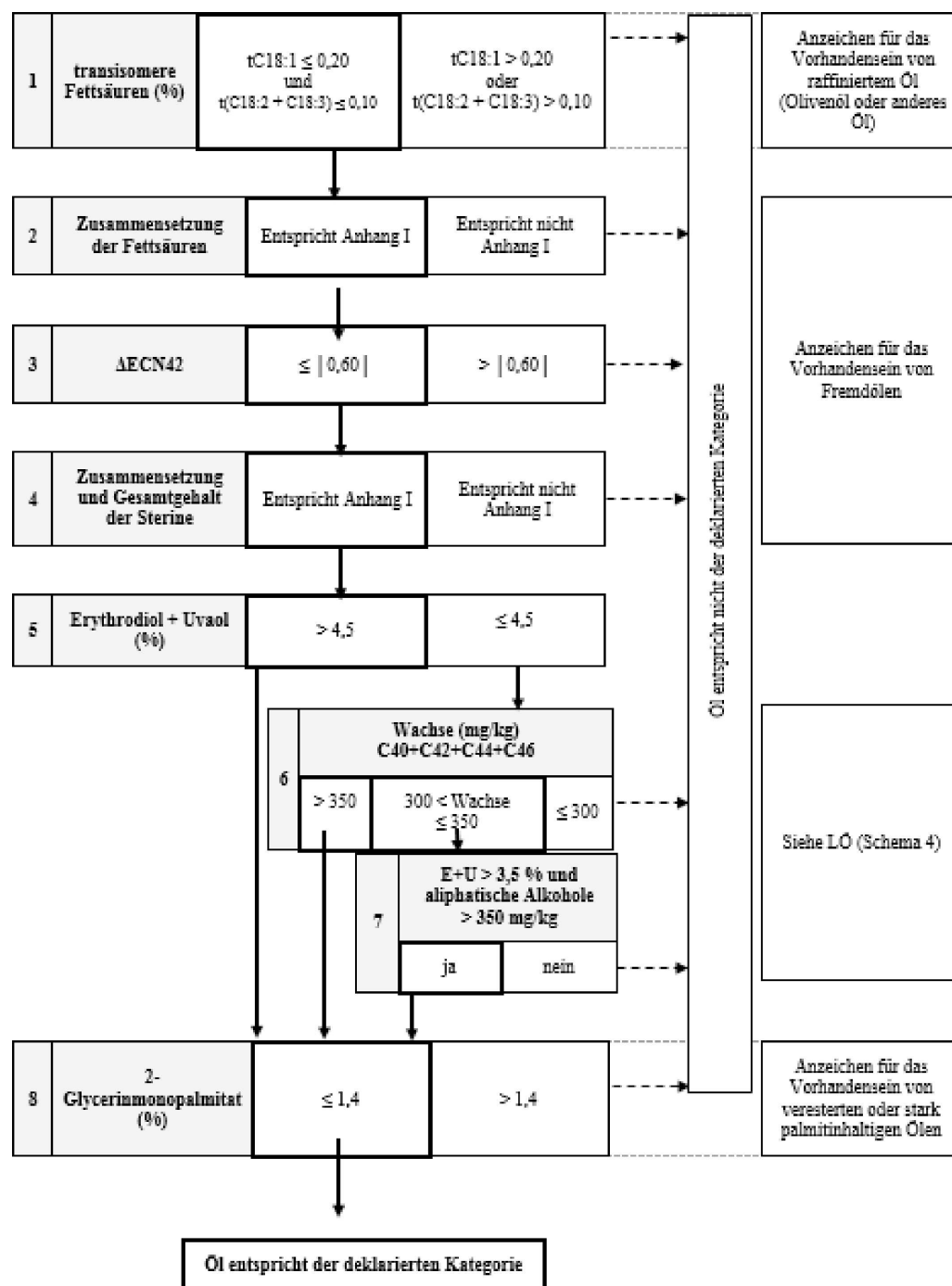
Schema 6 — Olivenöl (bestehend aus raffinierten Olivenölen und nativen Olivenölen) — Qualitätskriterien



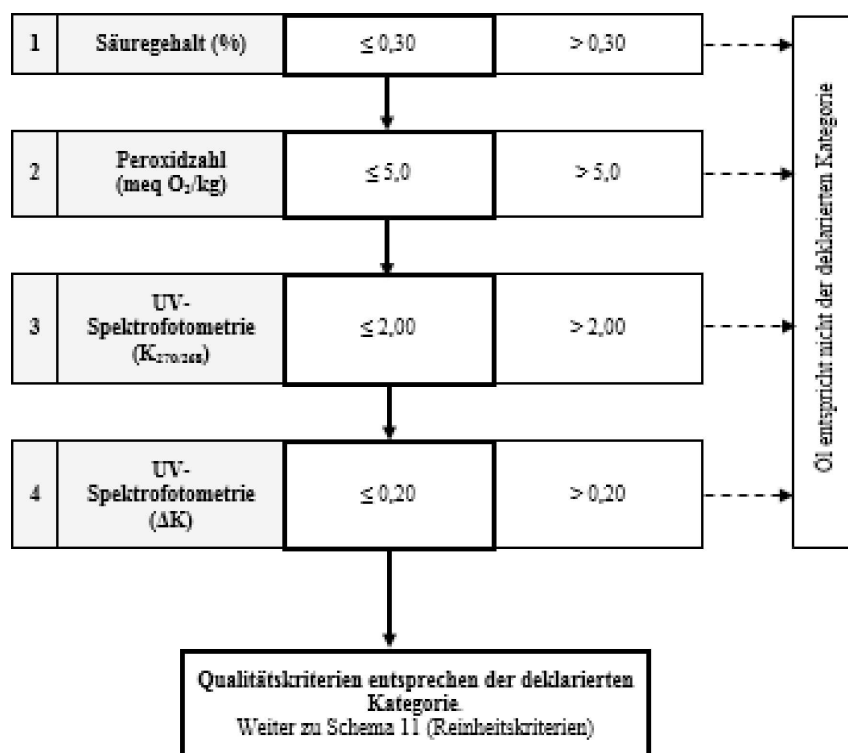
Schema 7 — Raffiniertes Olivenöl und Olivenöl bestehend aus raffinierten Olivenölen und nativen Olivenölen — Reinheitskriterien



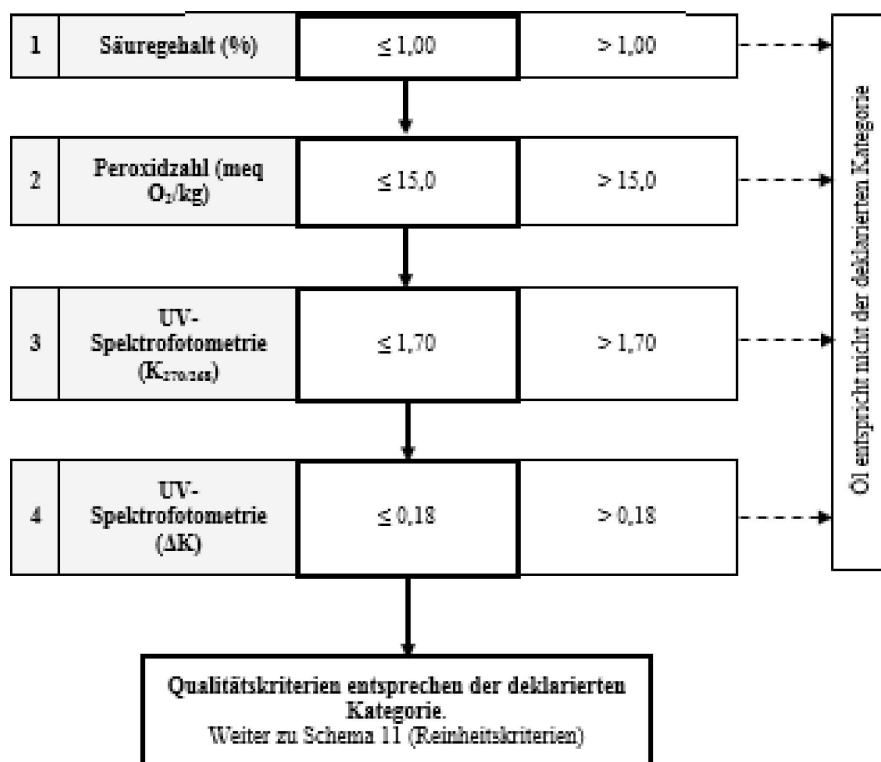
Schema 8 — Rohes Oliventresteröl — Reinheitskriterien



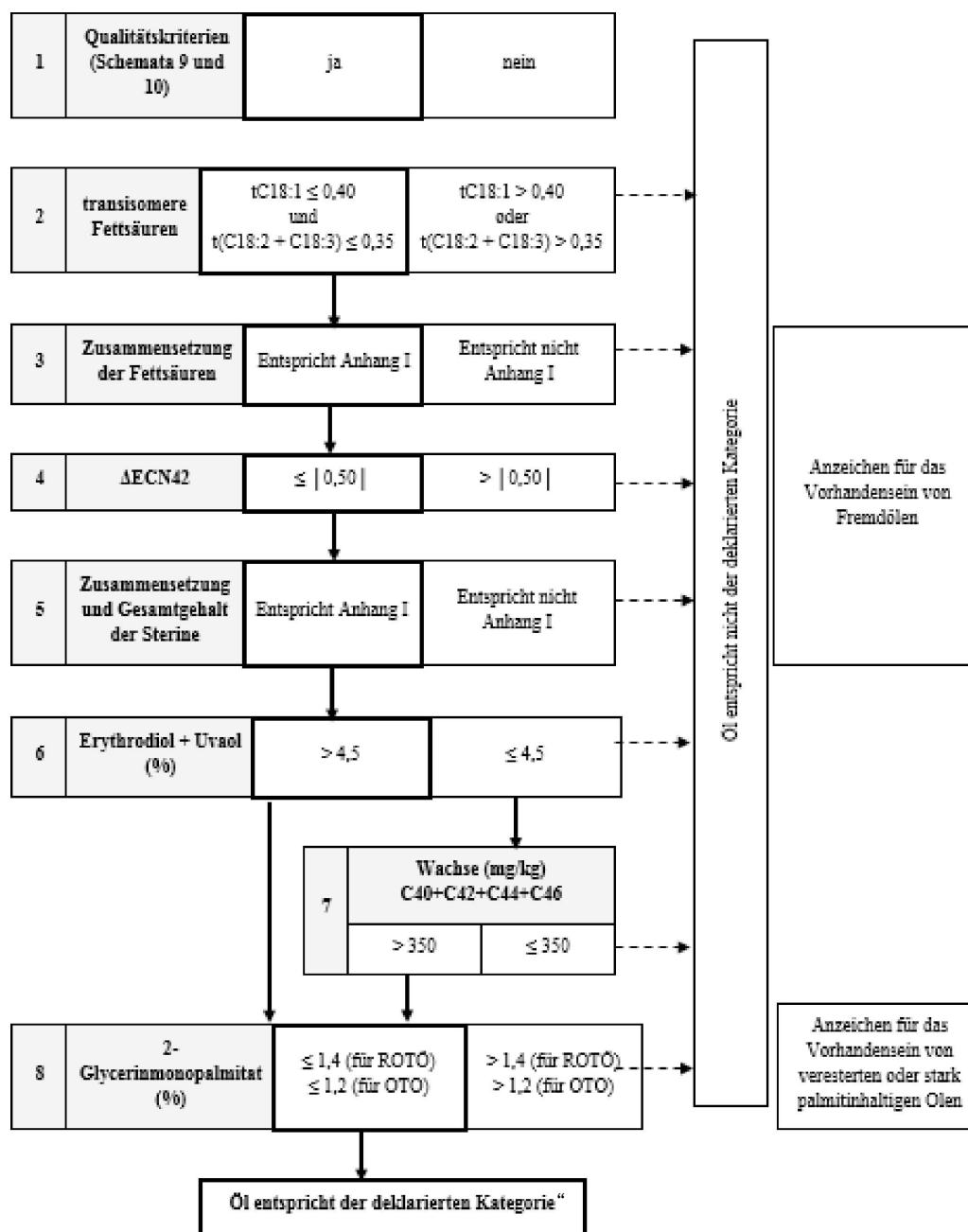
Schema 9 — Raffiniertes Oliventresteröl — Qualitätskriterien



Schema 10 — Oliventresteröl — Qualitätskriterien



Schema 11 — Raffiniertes Oliventresteröl und Oliventresteröl — Reinheitskriterien



ANHANG IV

Anhang XII wird wie folgt geändert:

1. Nummer 3.3 erhält folgende Fassung:

„3.3. 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 ausschließlich für die nachstehenden Bezeichnungen entsprechen.

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

- *intensiv*, wenn der Median des betreffenden Attributs größer als 6,0 ist;
- *mittel*, wenn der Median des betreffenden Attributs zwischen 3,0 und 6,0 liegt;
- *leicht*, wenn der Median des betreffenden Attributs kleiner als 3,0 ist.

<i>Fruchtigkeit</i>	Gesamtheit der von der Olivensorte abhängigen charakteristischen Geruchsmerkmale eines Öls aus gesunden, frischen Oliven, bei der weder grüne noch reife Fruchtigkeit vorherrscht. Sie wird unmittelbar und/oder retronasal wahrgenommen.
<i>Grüne Fruchtigkeit</i>	Gesamtheit der von der Olivensorte abhängigen, charakteristischen Geruchsmerkmale eines Öls aus grünen, gesunden, frischen Oliven, die an grüne Früchte erinnert. Sie wird unmittelbar und/oder retronasal wahrgenommen.
<i>Reife Fruchtigkeit</i>	Gesamtheit der von der Olivensorte abhängigen charakteristischen Geruchsmerkmale eines Öls aus gesunden, frischen Oliven, die an reife Früchte erinnert. Sie wird unmittelbar und/oder retronasal wahrgenommen.
<i>Ausgewogen</i>	Ein Öl, das nicht unausgewogen ist. Ausgewogenheit bezeichnet den olfaktorisch-gustatorischen und taktilen Sinneseindruck bei einem Öl, in dem der Median des Attributs 'bitter' und der Median des Attributs 'scharf' nicht mehr als 2,0 Punkte größer sind als der Median des Attributs 'fruchtig'.
<i>Mildes Öl</i>	Ein Öl, in dem der Median des Attributs 'bitter' und der des Attributs 'scharf' kleiner oder gleich 2,0 sind.

Bezeichnungen je nach Intensität der Wahrnehmung:

Bezeichnungen, für die eine Bescheinigung über eine organoleptische Prüfung vorzulegen ist	Median des Attributs
Fruchtigkeit	—
Reife Fruchtigkeit	—
Grüne Fruchtigkeit	—
Leichte Fruchtigkeit	$\leq 3,0$
Mittlere Fruchtigkeit	$3,0 < Me \leq 6,0$
Intensive Fruchtigkeit	$> 6,0$
Leichte reife Fruchtigkeit	$\leq 3,0$
Mittlere reife Fruchtigkeit	$3,0 < Me \leq 6,0$
Intensive reife Fruchtigkeit	$> 6,0$
Leichte grüne Fruchtigkeit	$\leq 3,0$
Mittlere grüne Fruchtigkeit	$3,0 < Me \leq 6,0$
Intensive grüne Fruchtigkeit	$> 6,0$

Bezeichnungen, für die eine Bescheinigung über eine organoleptische Prüfung vorzulegen ist	Median des Attributs
Leichte Bitterkeit	$\leq 3,0$
Mittlere Bitterkeit	$3,0 < Me \leq 6,0$
Intensive Bitterkeit	$> 6,0$
Leichte Schärfe	$\leq 3,0$
Mittlere Schärfe	$3,0 < Me \leq 6,0$
Intensive Schärfe	$> 6,0$
Ausgewogenes Öl	Der Median des Attributs 'bitter' und der Median des Attributs 'scharf' sind nicht mehr als 2,0 Punkte größer als der Median des Attributs 'fruchtig'.
Mildes Öl	Der Median des Attributs 'bitter' und der Median des Attributs 'scharf' sind nicht größer als 2,0.“

2. Nummer 9.4 erhält folgende Fassung:

„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.

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 0,0 und der Median des Attributs ‚fruchtig‘ ist größer als 0,0.
- b) Natives Olivenöl: Der Median der Mängel ist größer als 0,0, aber nicht größer als 3,5 und der Median des Attributs ‚fruchtig‘ ist größer als 0,0.
- 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 0,0.

Anmerkung 1: Ist der Median des Attributs ‚bitter‘ und/oder der des Attributs ‚scharf‘ größer als 5,0, so vermerkt der Prüfungsleiter dies auf der Prüfbescheinigung.

Im Falle von Bewertungen im Rahmen von Konformitätskontrollen wird ein Test vorgenommen. Im Fall von Gegenbewertungen muss die Analyse zweimal in verschiedenen Prüfgängen stattfinden. Die Ergebnisse dieser Doppelanalyse müssen statistisch homogen sein (siehe Abschnitt 9.5). Ist dies nicht der Fall, muss die Probe erneut zweimal analysiert werden. Der endgültige Wert des Medians der Einstufungsattribute wird anhand des Durchschnitts der beiden Mediane berechnet.“

ANHANG V

Anhang XVII wird wie folgt geändert:

1. Nummer 5.1 erhält folgende Fassung:

„5.1. Hexan oder Alkanmischung mit einem Siedebereich von 65-70 °C, destilliert in einer Rektifiziersäule. Hexan kann durch Isooctan (2,2,4-Trimethylpentan für die Chromatografie) ersetzt werden, sofern vergleichbare Präzisionswerte erreicht werden. Der Rückstand nach der Verdunstung von 100 ml Lösungsmittel kann kontrolliert werden. Lösungsmittel mit einem höheren Siedepunkt als n-Hexan verdunsten langsamer. Allerdings sind sie aufgrund der Toxizität von Hexan zu bevorzugen.“

2. Unter Nummer 6.3.3. wird folgender Wortlaut eingefügt:

„Anmerkung 10: Wenn Stigmastadiene in einer Konzentration von über 4 mg/kg auftreten und eine Quantifizierung erforderlich ist, muss das Verfahren des Internationalen Olivenölrates für die Bestimmung von Sterenen in raffinierten Ölen angewendet werden.“

ANHANG VI

Anhang XVIII wird wie folgt geändert:

1. Nummer 4.2.1. erhält folgende Fassung:

„4.2.1. Petrolether (40-60 °C) für die Chromatografie oder Hexan. Hexan kann durch Isooctan (2,2,4-Trimethylpentan für die Chromatografie) ersetzt werden, sofern vergleichbare Präzisionswerte erreicht werden. Lösungsmittel mit einem höheren Siedepunkt als n-Hexan verdunsten langsamer. Allerdings sind sie aufgrund der Toxizität von Hexan zu bevorzugen.“

2. Folgende Nummer 4.2.12. wird angefügt:

„4.2.12. Heptan, chromatografische Qualität. Hexan kann durch Isooctan (2,2,4-Trimethylpentan für die Chromatografie) ersetzt werden.“

ANHANG VII

„ANHANG XIX

BESTIMMUNG DER ZUSAMMENSETZUNG VON UND DES GEHALTS AN STERINEN UND DES GEHALTS AN ALKOHOLISCHEN VERBINDUNGEN DURCH KAPILLAR-GASCHROMATOGRAPHIE

1. GEGENSTAND

Diese Methode umfasst ein Verfahren zur Bestimmung des Gehalts jeder alkoholischen Verbindung sowie von deren Gesamtgehalt in Olivenölen und Oliventresterölen sowie in Mischungen dieser beiden Öle.

Die alkoholischen Verbindungen in Olivenölen und Oliventresterölen umfassen aliphatische Alkohole, Sterine und Triterpen-Dialkohole.

2. PRINZIP

Die Öle werden mit α -Cholestanol und 1-Eicosanol als internen Standards versetzt, mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung verseift und das Unverseifbare mit Ethylether extrahiert.

Die verschiedenen Fraktionen der alkoholischen Verbindungen werden von dem Unverseifbaren entweder mittels Dünnschichtchromatografie auf einer basischen Kieselgelplatte (Referenzverfahren) oder durch HPLC mittels Kieselgelsäule abgetrennt. Die über die Kieselgeltrennung isolierte Fraktion wird in Trimethylsilylether überführt und anschließend mithilfe der Kapillar-Gaschromatografie untersucht.

TEIL 1**HERSTELLUNG DES UNVERSEIFBAREN**

1. GEGENSTAND

In diesem Teil wird die Herstellung und Extraktion des Unverseifbaren beschrieben. Dieser Schritt umfasst die Herstellung und Extraktion des Unverseifbaren aus Olivenölen und Oliventresterölen.

2. PRINZIP

Eine Testmenge wird durch Kochen unter Rückfluss mit einer ethanolischen Kaliumhydroxidlösung verseift. Das Unverseifbare wird mittels Diethylether extrahiert.

3. GERÄTE

Übliche Laboreinrichtung und insbesondere nachstehende Geräte:

- 3.1. Rundkolben, mit Rückflusskühler und Schliffstopfen, 250 ml.
- 3.2. Scheidetrichter, 500 ml.
- 3.3. Kolben, 250 ml.
- 3.4. Mikroliterspritzen, 100 μ l und 500 μ l.
- 3.5. Glasfiliertiegel mit Porenfilter G 3 (Porosität 15-40 μ m), etwa 2 cm Durchmesser, 5 cm Höhe, geeignet für die Vakuumfiltration mit Normschliff (Kern).
- 3.6. Erlenmeyerkolben mit Normschliff (Hülse), 50 ml, für Glasfiliertiegel (3.5).
- 3.7. l-Röhrchen mit konischem Boden und dicht schließendem Glasstopfen, 10 ml.
- 3.8. Calciumdichlorid-Exsikkator.

4. REAGENZIEN

- 4.1. Kaliumhydroxid (Titer mindestens 85 %).

4.2. Kaliumhydroxid, ethanolische Lösung, etwa 2 M.

130 g Kaliumhydroxid (4.1) unter Kühlen in 200 ml destilliertem Wasser lösen und mit Ethanol (4.7) auf einen Liter auffüllen. Die Lösung ist in gut verschlossenen Braunglasflaschen maximal zwei Tage haltbar.

4.3. Ethylether, analyserein.

4.4. Wasserfreies Natriumsulfat, analyserein.

4.5. Aceton für die Chromatografie.

4.6. Ethylether für die Chromatografie.

4.7. Ethanol, analyserein.

4.8. Ethylacetat, analyserein.

4.9. Interner Standard, α -Cholestanol, Reinheit mehr als 99 % (Reinheit mit GC-Analyse überprüfen).4.10. α -Cholestanol-Lösung, interner Standard, 0,2 %ige Lösung (m/V) in Ethylacetat (4.8).

4.11. Phenolphthalein-Lösung, 10 g/l in Ethanol (4.7).

4.12. 0,1 %ige Lösung (m/V) von 1-Eicosanol in Ethylacetat (interner Standard).

5. VERFAHREN

Mit einer 500- μ l-Mikroliterspritze (3.4) so viel der α -Cholestanol-Lösung (interner Standard) (4.10) und so viel 1-Eicosanol (4.12) in einen 250-ml-Kolben (3.1) geben, dass die Menge an Cholestanol und Eicosanol etwa 10 % des Sterin- und Alkoholgehalts der Probe entspricht. So werden z. B. für 5 g Olivenöl 500 μ l der α -Cholestanol-Lösung (4.10) und 250 μ l der 1-Eicosanol-Lösung (4.12) benötigt. Für Oliventresteröle werden 1 500 μ l sowohl der α -Cholestanol-Lösung (4.10) als auch der 1-Eicosanol-Lösung (4.12) hinzugefügt. Im leichten Stickstoffstrom im warmen Wasserbad bis zur Trocknung abdampfen. Nach dem Abkühlen des Kolbens in den gleichen Kolben $5,00 \pm 0,01$ g der trockenen und filtrierten Probe einwiegen.

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

Die Probe bei aufgesetztem Rückflusskühler mit 50 ml 2-M-ethanolischer Kaliumhydroxidlösung (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.

Den Kolbeninhalt quantitativ in einen 500-ml-Scheidetrichter (3.2) überführen, wobei mehrfach mit destilliertem Wasser (50 ml) nachgespült wird. Die Probe mit etwa 80 ml Ethylether (4.6) versetzen, etwa 60 Sekunden kräftig schütteln und den Druck durch Umdrehen des Scheidetrichters und Öffnen des Sperrhahns periodisch entlassen. 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 (4.6) extrahieren.

Anmerkung 2: Etwaige Emulsionen können durch Zusatz kleiner Mengen Ethanol (4.7) zerstört werden.

Die drei Etherauszüge in einem Scheidetrichter mit 50 ml Wasser vereinigen. Weiter mit Wasser (50 ml) waschen, bis sich das Waschwasser bei Zusatz eines Tropfens Phenolphthalein-Lösung (4.11) nicht mehr rosa färbt. Nach Ablassen des Waschwassers über wasserfreiem Natriumsulfat (4.4) in einen zuvor gewogenen 250-ml-Kolben filtrieren. Scheidetrichter und Filter mit kleinen Mengen Ethylether (4.6) nachspülen.

Das Lösungsmittel durch Destillieren in einem Rotationsverdampfer bei 30 °C im Vakuum eindampfen. 5 ml Aceton (4.5) hinzugeben und das flüchtige Lösungsmittel in einem leichten Stickstoffstrom vollständig entfernen. Den Rückstand bei $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ im Trockenschrank 15 Minuten lang trocknen. Im Exsikkator abkühlen lassen und auf 0,1 mg genau wiegen.

TEIL 2**TRENNUNG DER FRAKTIONEN DER ALKOHOLISCHEN VERBINDUNGEN****1. GEGENSTAND**

Das unter Teil 1 hergestellte Unverseifbare wird in die verschiedenen alkoholischen Verbindungen, nämlich aliphatische Alkohole, Sterine und Triterpen-Dialkohole (Erythrodiol und Uvaol), fraktioniert.

2. PRINZIP

Das Unverseifbare kann mittels basischer Dünnschichtchromatografie (Referenzverfahren) fraktioniert und sichtbar gemacht werden und die entsprechenden Banden können abgekratzt und extrahiert werden. Als alternative Trennmethode kann eine HPLC mit Kieselgelsäule und einem UV-Detektor verwendet und können die verschiedenen Fraktionen gesammelt werden. Die aliphatischen und Triterpen-Alkohole sowie die Sterine und Triterpen-Dialkohole werden gemeinsam isoliert.

3. GERÄTE

Übliche Laboreinrichtung und insbesondere nachstehende Geräte:

- 3.1. komplette Apparatur für die Dünnschichtchromatografie mit Glasplatten 20 × 20 cm.
- 3.2. UV-Lampe, Wellenlänge 366 oder 254 nm.
- 3.3. Mikroliterspritzen, 100 µl und 500 µl.
- 3.4. Glasfiliertiegel mit Porenfilter G 3 (Porosität 15-40 µm), etwa 2 cm Durchmesser, 5 cm Höhe, geeignet für die Vakuumfiltration mit Normschliff (Kern).
- 3.5. Erlenmeyerkolben mit Normschliff (Hülse), 50 ml, für Glasfiliertiegel (3.4).
- 3.6. l-Röhrchen mit konischem Boden und dicht schließendem Glasstopfen, 10 ml.
- 3.7. Calciumdichlorid-Exsikkator.
- 3.8. HPLC-System, bestehend aus:
 - 3.8.1. binärer Pumpe,
 - 3.8.2. manuellem oder automatischem Injektor mit einer Injektionsschleife von 200 µl,
 - 3.8.3. integriertem Entgaser,
 - 3.8.4. UV-VIS- oder IR-Detektor,
- 3.9. HPLC-Säule (25 cm × 4 mm Innendurchmesser), mit Kieselgel 60 (Korngröße 5 µm),
- 3.10. Spritzenfilter, 0,45 µm,
- 3.11. Erlenmeyerkolben, 25 ml.

4. REAGENZIEN

- 4.1. Kaliumhydroxid (Titer mindestens 85 %).
- 4.2. Kaliumhydroxid, ethanolische Lösung etwa 2 M.

130 g Kaliumhydroxid (4.1) unter Kühlen in 200 ml destilliertem Wasser lösen und mit Ethanol (4.9) auf einen Liter auffüllen. Die Lösung ist in gut verschlossenen Braunglasflaschen maximal zwei Tage haltbar.
- 4.3. Ethylether, analysenrein.
- 4.4. Kaliumhydroxid, ethanolische Lösung etwa 0,2 M.

13 g Kaliumhydroxid (4.1) in 20 ml destilliertem Wasser lösen und mit Ethanol (4.9) auf einen Liter auffüllen.
- 4.5. Kieselgelbeschichtete Glasplatten (20 × 20 cm) ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0,25 mm (gebrauchsfertig im Handel erhältlich).
- 4.6. Aceton für die Chromatografie.

- 4.7. n-Hexan für die Chromatografie.
- 4.8. Ethylether für die Chromatografie.
- 4.9. Ethanol, analyserein.
- 4.10. Ethylacetat, analyserein.
- 4.11. Referenzlösung für die Dünnschichtchromatografie: Cholesterol, Phytosterole, Alkohole und Erythrodiol-Lösung 5 % in Ethylacetat (4.10).
- 4.12. 0,2 %ige Lösung von 2,7-Dichlorfluorescein in ethanolischer Lösung. Leicht alkalisch durch Zusatz einiger Tropfen alkoholischer 2-M-Kaliumhydroxid-Lösung (4.2).
- 4.13. n-Hexan (4.7)/Ethylether (4.8)-Gemisch 65:35 (V/V).
- 4.14. Mobile Phase der HPLC, n-Hexan (4.7)/Ethylether (4.8) (1:1) (V/V).

5. REFERENZMETHODE: TRENNUNG DER ALKOHOOLISCHEN VERBINDUNGEN MITTELS BASISCHER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE-PLATTE

Vorbereitung der basischen Dünnschichtchromatografie-Platten. Die Kieselgelplatten (4.5) etwa 4 cm tief und ca. 10 Sekunden lang in eine 0,2 M-ethanolische Kaliumhydroxid-Lösung (4.4) ein- oder untertauchen, dann unter einem Abzug 2 Stunden trocknen lassen, anschließend 1 Stunde bei 100 °C in den Trockenschrank legen.

Die Platten aus dem Trockenschrank nehmen und in einem Exsikkator über Calciumchlorid (3.7) bis zum Gebrauch aufbewahren. (Derart behandelte Platten müssen innerhalb von 15 Tagen verwendet werden.)

Die Entwicklerkammer bis zu einer Höhe von etwa 1 cm mit einem Hexan/Ethylether-Gemisch (4.13) (Anmerkung 3) 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 Elutionsmittel eintauchen. Dadurch kann die Laufzeit um ein Drittel verkürzt und eine gleichmäßige Elution der Komponenten erzielt werden.

Anmerkung 3: Das Elutionsmittel sollte für jeden Test frisch angesetzt werden, damit die Wiederholbarkeit der Elution gewährleistet ist. Als alternatives Lösungsmittel kann n-Hexan/Ethylether 50:50 (V/V) verwandt werden.

Eine etwa 5 %ige Lösung des unter Teil 1 hergestellten Unverseifbaren in Ethylacetat (4.10) vorbereiten und mit einer 100- μ l-Mikroliterspritze (3.3) 0,3 ml der Lösung als dünnen, gleichmäßigen Strich auf den unteren Rand (2 cm) der Chromatografieplatte (4.5) auftragen. In der Verlängerung der Startlinie werden 2-3 μ l der Referenzlösung (4.11) aufgetragen, um die Sterin-, Triterpen-Dialkohol- und Alkoholbanden nach der Entwicklung zu identifizieren.

Die Platte in die Entwicklerkammer (3.1) stellen. Die Temperatur der Umgebung sollte 15-20 °C betragen (Anmerkung 4). Die Kammer sofort mit dem Deckel verschließen und die Platte so lange eluieren, bis die Elutionsmittelfront etwa 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 kurze Zeit unter dem Abzug liegen lassen, um das Lösungsmittel abzdampfen.

Anmerkung 4: Eine höhere Temperatur könnte die Separation verschlechtern.

Die Platte vorsichtig und gleichmäßig mit 2',7'-Dichlorfluoresceinlösung (4.12) besprühen und anschließend trocknen lassen. Unter UV-Licht (3.2) können auf der Platte die Sterin-, Triterpen-Dialkohol- und Alkoholbanden mithilfe der Flecke der Referenzlösung (4.11) bestimmt werden. Die Bandbegrenzungen entlang der Ränder des fluoreszierenden Bereichs mit einem schwarzen Stift markieren (siehe Dünnschichtplatte in Abbildung 1).

Das in der markierten Zone liegende Kieselgel mit einem Metallspatel abkratzen, fein mahlen und in einen Glasfiliertiegel (3.4) überführen. Mit 10 ml heißem Ethylacetat (4.10) versetzen, mithilfe des Metallspatels vorsichtig vermischen und (ggf. unter Vakuum) filtrieren. Das Filtrat in dem an dem Glasfiliertiegel angeschlossenen Erlenmeyerkolben (3.5) auffangen.

Den Rückstand in der Flasche dreimal mit je ca. 10 ml Ethylether (4.3) waschen und das Filtrat wiederum in dem an dem Glasfiliertiegel angeschlossenen Erlenmeyerkolben 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 (3.6) überführen. Durch vorsichtiges Erhitzen unter einem schwachen Stickstoffstrom bis zur Trocknung eindampfen. Mit einigen Tropfen Aceton (4.6) versetzen, wieder bis zur Trocknung eindampfen. Der Rückstand in dem Probenglas besteht aus den Sterin- und Triterpen-Dialkohol-Fractionen oder den Alkohol- und Triterpen-Alkohol-Fractionen.

6. TRENNUNG DER ALKOHOL-FRAKTION DURCH HPLC

Das Unverseifbare aus Teil 1 in 3 ml der mobilen Phase (4.14) auflösen und die Lösung mit einem Spritzenfilter (3.10) filtern und aufbewahren.

200 µl der gefilterten Lösung des Unverseifbaren in das HPLC-System (3.8) einführen.

HPLC-Trennung mit einem Fluss von 0,8 ml/min laufen lassen, die ersten 5 Minuten außer Acht lassen und im Zeitraum zwischen 5 und 10 min die aliphatischen und Triterpen-Alkohole und im Zeitraum zwischen 11 und 25 min die Sterine sowie Erythrodiol und Uvaol in Erlenmeyerkolben mit 25 ml Fassungsvermögen (3.11) auffangen (Anmerkung 5).

Die Trennung kann mittels eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 210 nm oder mittels eines Refraktionsindexdetektors überwacht werden (siehe Abbildung 6).

Die Fraktionen bis zur Trocknung eindampfen und für die chromatografische Analyse vorbereiten.

Anmerkung 5: Der Druck der HPLC-Pumpe muss sorgsam kontrolliert werden, da Ethylester den Druck erhöhen kann, und die Flussrate muss angepasst werden, um den Druck unter Kontrolle zu halten.

TEIL 3

GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE DER FRAKTIONEN DER ALKOHOLISCHEN VERBINDUNGEN

1. GEGENSTAND

Dieser Teil enthält allgemeine Leitlinien zur Anwendung der Kapillar-Gaschromatografie, um die qualitative und quantitative Zusammensetzung der nach der in Teil 2 dargelegten Methode isolierten alkoholischen Verbindungen zu bestimmen.

2. PRINZIP

Die mittels TLC oder HPLC aus dem Unverseifbaren gesammelten Fraktionen werden in Trimethylsilylether überführt und mittels Kapillar-Gaschromatografie mit Split-Injektion und Flammenionisationsdetektor analysiert.

3. GERÄTE

Übliche Laboreinrichtung und insbesondere nachstehende Geräte:

- 3.1. 1-Röhrchen mit konischem Boden und dicht schließendem Glasstopfen, 10 ml.
- 3.2. Gaschromatograf, geeignet für die Verwendung von Kapillarsäulen mit Splitsystem, bestehend aus:
 - 3.2.1. einem thermostatisierbaren Säulenofen, einstellbar auf die gewünschte Temperatur mit einer Genauigkeit von ± 1 °C,
 - 3.2.2. einem temperaturregelbaren Injektor mit Verdampfer aus persilanisiertem Glas und Splitsystem,
 - 3.2.3. einem Flammenionisationsdetektor (FID),
 - 3.2.4. einem Datenerfassungssystem, geeignet zur Verwendung mit dem FID (3.10.3), manuell integrierbar.
- 3.3. Fused-Silica-Kapillarsäule, 20 bis 30 m Länge, 0,25 bis 0,32 mm Innendurchmesser, beschichtet mit 5 % Diphenyl-/95 % Dimethylpolysiloxan (SE-52 oder SE-54 stationäre Phase oder gleichwertig), gleichmäßige Schichtdicke zwischen 0,10 und 0,30 µm.
- 3.4. Mikroliterspritze für die Gaschromatografie, 10 µl, mit gehärteter Nadel, geeignet für Split-Injektion.

4. REAGENZIEN

- 4.1. Wasserfreies Pyridin für die Chromatografie.
- 4.2. Hexamethyldisilazan, analyserein.
- 4.3. Trimethylchlorsilan, analyserein.

- 4.4. Probeflösungen von Sterin-Trimethylsilylethern, unmittelbar vor Gebrauch ansetzen mit Sterinen und Erythrodiol aus Ölen, in denen sie enthalten sind.
- 4.5. Standardlösungen der Trimethylsilylether der aliphatischen Alkohole von C20 bis C28. Sie können unmittelbar vor Gebrauch aus einer Mischung reiner Alkohole angesetzt werden.
- 4.6. Trägergas: Wasserstoff oder Helium, rein, für die Gaschromatografie.
- 4.7. Hilfsgase: Wasserstoff, Helium, Stickstoff und Luft, rein, für die Gaschromatografie.
- 4.8. Silanisierungsreagenz, bestehend aus einem Gemisch aus Pyridin, Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan im Verhältnis 9:3:1 (V/V/V).
- 4.9. n-Hexan für die Chromatografie.

5. HERSTELLUNG DER TRIMETHYLSILYLETHER

Dem Probengläschen (3.1) mit der Fraktion der alkoholischen Verbindung werden je Milligramm alkoholischer Verbindung 50 µl Silanisierungsreagenz (4.8) zugesetzt (Anmerkung 6), 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 % Trimethylchlorsilan, das mit gleichen Teilen wasserfreiem Pyridin gemischt werden muss. Pyridin kann durch die gleiche Menge Acetonitril ersetzt 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 muss der Test wiederholt werden (nur bei Verwendung von Hexamethyldisilazan/Trimethylchlorsilan).

Das Probengläschen (3.1) verschließen und vorsichtig (ohne es auf den Kopf zu stellen) 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 gaschromatografisch analysiert werden.

6. GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE

6.1. Vorbereiten, Konditionieren der Kapillarsäule,

Die Säule (3.3) in den Gaschromatografen einsetzen, wobei das Einlassteil an den Split-Injektor und das Auslassteil an den Detektor angeschlossen wird.

Überprüfung des Gaschromatografen (Dichtigkeit der Gasleitungen, Betriebsbereitschaft des Detektors, des Splitsystems, des Schreibers usw.).

Wird die Säule zum ersten Mal verwendet, ist es ratsam, sie zu konditionieren: Einen schwachen Gasstrom durch die Säule selbst geben, den Gaschromatografen einschalten und allmählich auf eine Temperatur von mindestens 20 °C über der Arbeitstemperatur (Anmerkung 8) aufheizen. Diese Temperatur mindestens 2 Stunden konstant halten, dann das gesamte Gerät in den Betriebsmodus setzen (Anpassung der Gasströme und des Splitsystems, Zünden der Flamme, Rechensystemanschluss, Einstellen der Säulen-, Injektor- und Detektortemperatur usw.). Dann eine Empfindlichkeit wählen, die mindestens doppelt so groß ist wie die für die Analyse vorgesehene, und das Signal aufzeichnen. Die Grundlinie muss linear verlaufen, ohne Peaks oder Drift. Eine negative Drift von der Grundlinie ist ein Indiz für einen undichten Anschluss der Säule, eine positive deutet auf ein mangelhaftes Konditionieren der Säule hin.

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

6.2. Betriebsbedingungen

Das Temperaturprogramm und der Fluss des Trägergases sind so zu optimieren, dass Chromatogramme wie in den Abbildungen 3 bis 6 erzielt werden.

Die folgenden Parameter wurden getestet und für nützlich befunden:

6.2.1. Aliphatische Alkohole

Ofenprogramm	180 °C (8 min) → 260 °C (je 5 °C/min.) → 260 °C (15 min)
Injektortemperatur	280 °C
Detektortemperatur	290 °C
Lineargeschwindigkeit des Trägergases	Helium (20-30 cm/s); Wasserstoff (30-50 cm/s)
Splitverhältnis	1:50 bis 1:100
Injiziertes Volumen	0,5-1 µl TMSE-Lösung

6.2.2. Sterin und Triterpen-Dialkohole

Ofenprogramm	260 ± 5 °C isotherm
Injektortemperatur	280-300 °C
Detektortemperatur	280-300 °C
Lineargeschwindigkeit des Trägergases	Helium (20-30 cm/s); Wasserstoff (30-50 cm/s)
Splitverhältnis	1:50 bis 1:100
Injiziertes Volumen	0,5-1 µl TMSE-Lösung

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

- Die Retentionszeit des C26-Alkohols muss 18 ± 5 Minuten betragen.
- Der Peak des C22-Alkohols muss bei Olivenöl 80 ± 20 % der gesamten Skala und bei Oliventresteröl 40 ± 20 % der gesamten Skala erreichen.
- Die Retentionszeit des Peaks von β -Sitosterol muss 20 ± 5 Minuten betragen.
- Der Campesterol-Peak muss bei Olivenöl (Durchschnittsgehalt 3 %) 20 ± 5 % der gesamten Skala erreichen.
- Alle enthaltenen Sterine müssen getrennt werden. Die Peaks müssen nicht nur getrennt, sondern auch 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) mithilfe der Senkrechten quantitativ zu bestimmen ist.

6.3. Durchführung der Analyse

Mit der 10-µl-Mikroliterspritze (3.4) 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 geleert wird. 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.

Das Chromatogramm aufzeichnen, bis die TMSE der entsprechend vorhandenen alkoholischen Verbindungen vollständig eluiert sind. Die Grundlinie muss stets den Anforderungen der entsprechenden Betriebsbedingungen (6.2.1 oder 6.2.2) genügen.

6.4. Identifizierung der Peaks

Die einzelnen Peaks werden anhand der Retentionszeiten und durch Vergleich mit dem unter denselben Bedingungen analysierten Gemisch der TMSE der aliphatischen und der Triterpen-Alkohole oder der Sterine und der Triterpen-Dialkohole bestimmt. Ein Chromatogramm der Fraktion der aliphatischen und Triterpen-Alkohole ist in Abbildung 3 dargestellt und die entsprechenden Chromatogramme für Sterine und Triterpen-Dialkohole sind der Abbildung 2 zu entnehmen.

Die aliphatischen Alkohole werden in folgender Reihenfolge eluiert: C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol und C28-ol.

Die Sterine und Triterpen-Dialkohole werden in folgender Reihenfolge eluiert: Cholesterol, Brassicasterol, Ergosterol, 24-Methylen-Cholesterol, Campesterol, Campestanol, Stigmasterol, Δ^7 -Campesterol, $\Delta^5,23$ -Stigmastadienol, Clerosterol, β -Sistosterol, Sitostanol, Δ^5 -Avenasterol, $\Delta^5,24$ -Stigmastadienol, Δ^7 -Stigmastenol, Δ^7 -Avenasterol, Erythrodiol und Uvaol.

6.5. Quantitative Bestimmung

Die Peak-Bereiche von 1-Eicosanol und der aliphatischen Alkohole C22, C24, C26 und C28 werden mittels eines Datenerfassungssystems berechnet. Der Responsefaktor von 1-Eicosanol soll gleich 1 gesetzt werden.

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

Der Konzentration jeder einzelnen alkoholischen Verbindung in mg/kg Fett wird nach folgender Formel berechnet:

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

Darin bedeuten:

A_x = Peakfläche der alkoholischen Verbindung x in Computer-Counts.

A_s = Peakfläche von 1-Eicosanol/ α -Cholestanol in Computer-Counts.

m_s = zugesetzte Menge an 1-Eicosanol/ α -Cholestanol in mg.

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

7. ERGEBNISSE

Die Konzentration der einzelnen aliphatischen und Triterpen-Alkohole wird in mg/kg Fett angegeben, ihre Summe als ‚Gesamtgehalt an aliphatischen Alkoholen‘. Der Gesamtgehalt ergibt sich aus der Summe von C22, C24, C26 und C28.

Die Zusammensetzung der einzelnen alkoholischen Verbindungen wird mit einer Dezimalstelle angegeben.

Die Gesamtkonzentration von Sterin ist ohne Dezimalstelle anzugeben.

Der prozentuale Anteil jedes einzelnen Sterins errechnet sich aus dem Quotienten der Peakfläche des entsprechenden Peaks und der Summe der Peakflächen aller Sterine:

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

Darin bedeuten:

A_x = Peakfläche des Sterins x.

ΣA = Summe der Peakflächen aller Sterine.

Apparentes β -Sistosterol: $\Delta^5,23$ -Stigmastadienol + Clerosterol + β -Sistosterol + Sitostanol + Δ^5 -Avenasterol + $\Delta^5,24$ -Stigmastadienol.

Der prozentuale Anteil von Erythrodiol und Uvaol errechnet sich nach der Formel:

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

Darin bedeuten:

A_{Er} = Fläche von Erythrodiol in Computer-Counts.

A_{Uv} = Fläche von Uvaol in Computer-Counts.

ΣA_{T} = Gesamtfläche von Sterin + Erythrodiol + Uvaol in Computer-Counts.

Neben der Berechnung des relativen Anteils der einzelnen Sterine und Triterpen-Dialkohole und der Gesamtkonzentration der Sterine muss die Konzentration von Erythrodiol und Uvaol sowie deren Summe in mg/kg Fett nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Erythrodiol} = \frac{A_{\text{Er}} \times m_{\text{s}}}{A_{\text{s}} \times m} \times 1\,000$$

$$\text{Uvaol} = \frac{A_{\text{Uv}} \times m_{\text{s}}}{A_{\text{s}} \times m} \times 1\,000$$

Darin bedeuten:

A_{Er} = Peakfläche von Erythrodiol in Computer-Counts.

A_{Uv} = Fläche von Uvaol 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.

Anlage

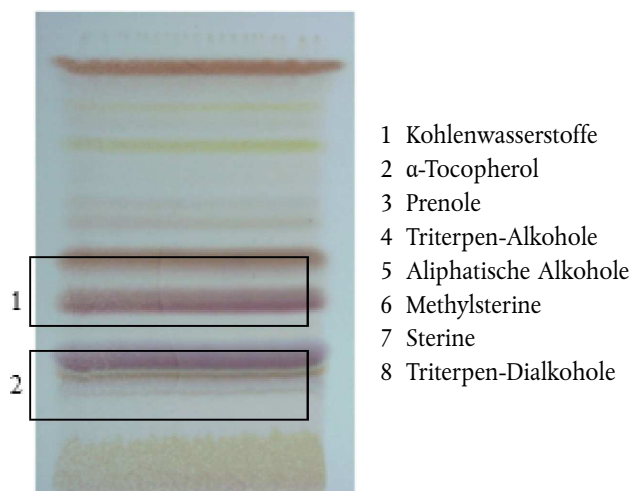


Abbildung 1 — TLC der unverseifbaren Fraktion aus Oliventresteröl, zweifach mit Hexan:Diethylether (65:35) eluiert, entwickelt mit SO_4H_2 (50 %) und erhitzt. Die abzukratzenden Banden sind in den Rechtecken zu sehen; Rechteck 1 sind die Banden von aliphatischen Alkoholen und Rechteck 2 die von Sterinen und Triterpen-Dialkoholen.

Tabelle I — Relative Retentionszeiten der Sterine

Peak	Identifizierung		Relative Retentionszeit	
			Säule SE 54	Säule SE 52
1	Cholesterol	Δ -5-Cholesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	Cholestanol	5 α -Cholestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brassicasterol	[24S]-24-Methyl- Δ -5,22-Cholestadien-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-Methyl- Δ -5,7,22 cholestatrien-3 β -ol	0,78	0,76
4	24-Methylen-Cholesterol	24-Methylen- Δ -5,24-Cholestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	Campesterol	(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	Stigmasterol	(24S)-24-Ethyl- Δ -5,22-Cholestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-Campesterol	(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	Clerosterol	(24S)-24-Ethyl- Δ -5,25-Cholestadien-3 β -ol	0,96	0,96

Peak	Identifizierung		Relative Retentionszeit	
			Säule SE 54	Säule SE 52
11	β -Sitosterol	(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-Avenasterol	(24Z)-24-Ethyliden- 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-Avenasterol	(24Z)-24-Ethyliden- Δ -7-Cholesten-3 β -ol	1,16	1,16
17	Erythrodiol	5 α -Olean-12-en-3 β ,28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-Ursen-3 β ,28-diol	1,52	1,52

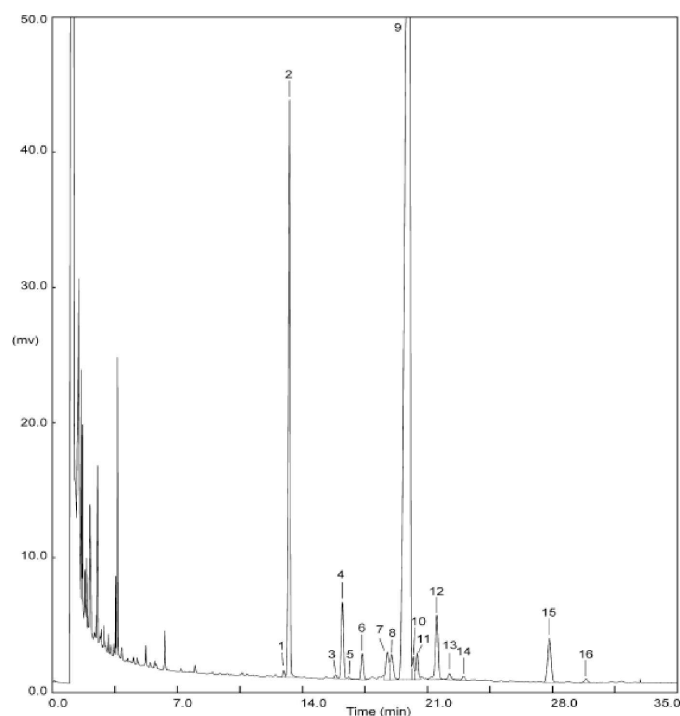


Abbildung 2 — GC-FID chromatografisches Profil der Sterine und Triterpen-Dialkohole aus raffiniertem Olivenöl. 1) Cholesterol, 2) α -Cholestanol (I.S.), 3) 24-Methylencholesterol, 4) Campesterol, 5) Campestanol, 6) Stigmasterol, 7) Δ 5,23-Stigmastadienol, 8) Clerosterol, 9) β -Sitosterol, 10) Sitostanol, 11) Δ 5-Avenasterol, 12) Δ 5,24-Stigmastadienol, 13) Δ 7-Stigmastenol, 14) Δ 7-Avenasterol, 15) Erythrodiol, 16) Uvaol.

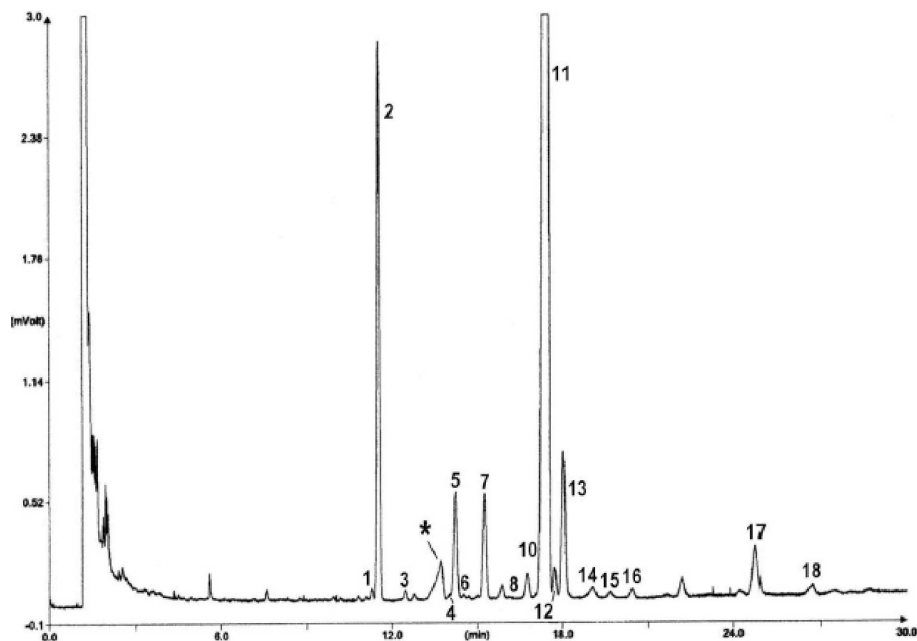


Abbildung 3 — GC-FID chromatografisches Profil der Sterine und Triterpen-Dialkohole aus Lampantöl. 1) Cholesterol, 2) α -Cholestanol, 3) Brassicasterol, 4) 24-Methylencholesterol, 5) Campesterol, 6) Campestanol, 7) Stigmasterol, 8) Δ^7 -Campesterol, 9) $\Delta^{5,23}$ -Stigmastadienol, 10) Clerosterol, 11) β -Sitosterol, 12) Sitostanol, 13) Δ^5 -Avenasterol, 14) $\Delta^{5,24}$ -Stigmastadienol, 15) Δ^7 -Stigmastenol, 16) Δ^7 -Avenasterol, 17) Erythrodiol, 18) Uvaol.

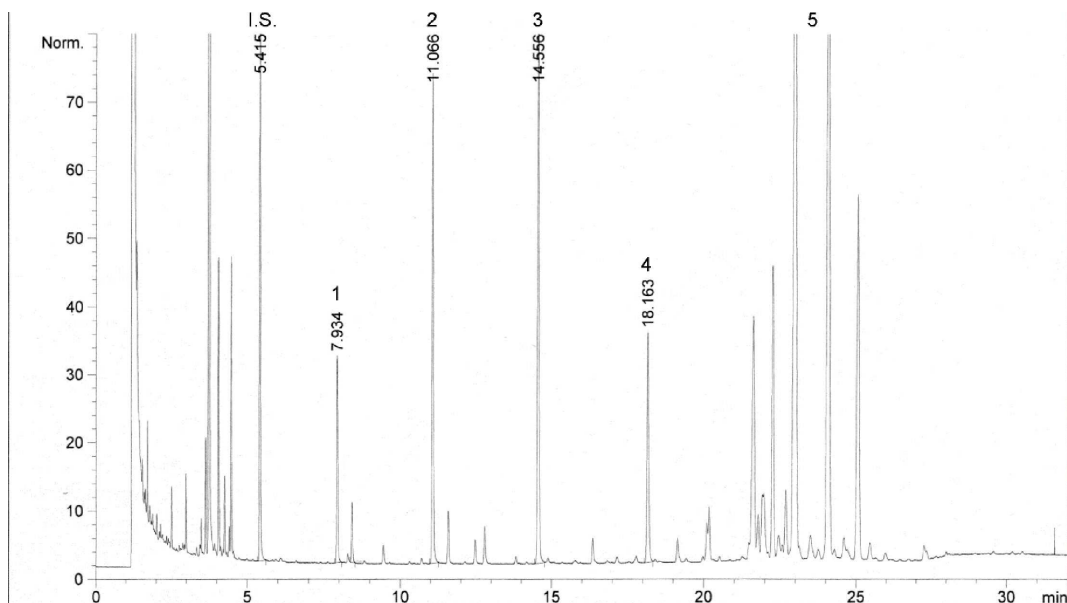


Abbildung 4 — GC-FID chromatografisches Profil der aliphatischen und Triterpen-Alkohole aus Olivenöl. (I.S.) C20-ol, 1) C22-ol, 2) C24-ol, 3) C26-ol, 4) C28-ol, 5) Triterpen-Alkohole.

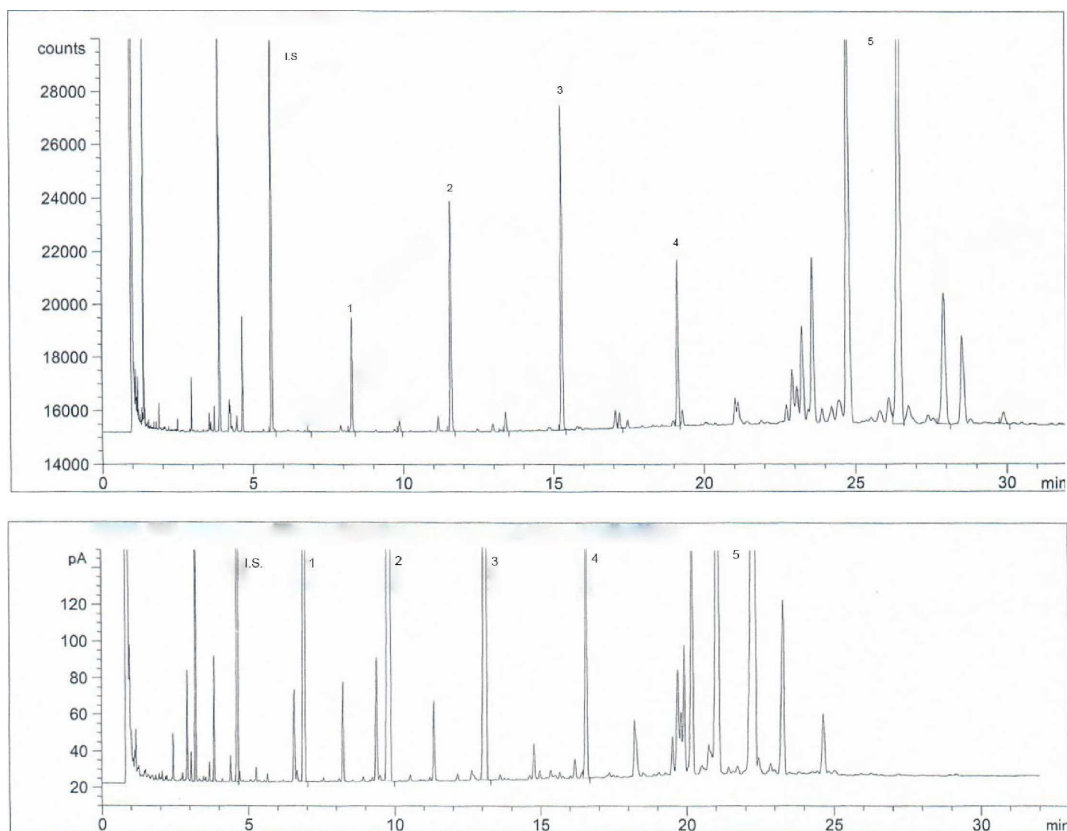


Abbildung 5 — GC-FID chromatografisches Profil der aliphatischen und Triterpen-Alkohole eines raffinierten Olivenöls und eines Olivenöls aus der zweiten Zentrifugation. (I.S.) C20-ol, 1) C22-ol, 2) C24-ol, 3) C26-ol, 4) C28-ol, 5) Triterpen-Alkohole.

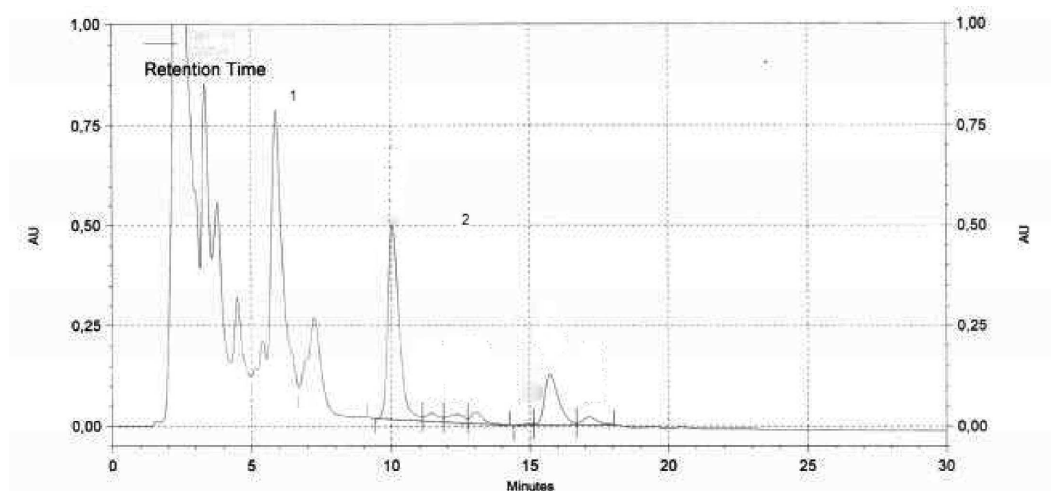


Abbildung 6 — HPLC-Chromatogramm eines Olivenöls, Unverseifbares getrennt durch HPLC mittels eines UV-Detektors. 1) Aliphatische und Triterpen-Alkohole; 2) Sterine und Triterpen-Dialkohole.“