

**VERORDNUNG (EG) Nr. 796/2002 DER KOMMISSION**

**vom 6. Mai 2002**

**zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 über die Merkmale von Olivenölen und Oliventresterölen sowie die Verfahren zu ihrer Bestimmung und der zusätzlichen Anmerkungen im Anhang der Verordnung (EWG) Nr. 2658/87 des Rates über die zolltarifliche und statistische Nomenklatur sowie den Gemeinsamen Zolltarif**

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

(EWG) Nr. 2568/91 gestrichen und einige Fehler in deren Text bereinigt werden.

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung Nr. 136/66/EWG des Rates vom 22. September 1966 über die Errichtung einer gemeinsamen Marktorganisation für Fette<sup>(1)</sup>, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1513/2001<sup>(2)</sup>, insbesondere auf Artikel 35a,

gestützt auf die Verordnung (EWG) Nr. 2658/87 des Rates vom 23. Juli 1987 über die zolltarifliche und statistische Nomenklatur sowie den Gemeinsamen Zolltarif<sup>(3)</sup>, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 578/2002<sup>(4)</sup>, insbesondere auf Artikel 9,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) In der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 der Kommission vom 11. Juli 1991 über die Merkmale von Olivenölen und Oliventresterölen sowie die Verfahren zu ihrer Bestimmung<sup>(5)</sup>, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 2042/2001<sup>(6)</sup>, sind die physikalischen, chemischen und organoleptischen Merkmale von Olivenöl und Oliventresteröl sowie die Verfahren zur Bestimmung dieser Merkmale festgelegt. Seit 1. November 2001 ist in der in Nummer 4 des Anhangs der Verordnung Nr. 136/66/EWG festgelegten Definition von rohem Oliventrester vorgesehen, dass bestimmtes Öl aus Oliventrester mit Ausnahme bestimmter Merkmale Lampantöl entspricht.
- (2) Um abgepresstes Tresteröl und Lampantöl in Ermangelung eines Analyseparameters zu unterscheiden, empfiehlt es sich, Grenzwerte für den Wachs-, Erythrodiol- und Uvaolgehalt bzw. den Gesamtgehalt an aliphatischen Alkoholen zur Differenzierung dieser Öle unabhängig von der Art ihrer Gewinnung festzusetzen. Hierzu ist ein Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts an aliphatischen Alkoholen festzulegen.
- (3) Diese neuen Grenzwerte machen eine Änderung der zusätzlichen Anmerkung Nr. 2 zu Kapitel 15 der Kombinierten Nomenklatur im Anhang I der Verordnung (EWG) Nr. 2658/87 erforderlich. Bei dieser Gelegenheit können Artikel 5 und Anhang XIV der Verordnung

- (4) Um die Verfahren zur Zubereitung der Fettsäuremethylester für die Analyse der Fettsäurezusammensetzung des Öls zu harmonisieren, erlaubt es die Entwicklung der Analysetechnik anhand des Gehalts an freien Fettsäuren die Anzahl der Analysemethoden in Anhang X B der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 auf zwei zu verringern.
- (5) Auf der Grundlage der bisherigen Erfahrungen hat der Internationale Olivenölrat ein neues Verfahren zur Bewertung der organoleptischen Merkmale nativer Olivenöle entwickelt. Dieses Verfahren ist zuverlässiger und einfacher als das bisherige Verfahren nach Anhang XII der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91. Daher ist Letzteres durch das neue Verfahren zu ersetzen.
- (6) Zur Anwendung des neuen Verfahrens zur Bewertung der organoleptischen Merkmale muss für den Fall des Widerspruchs zwischen der angegebenen und der bei der Bewertung durch die Prüfergruppe zugeteilten Kategorie ein Schiedsverfahren vorgesehen werden.
- (7) Um die Bedingungen für die Durchführung der Analysen zu gewährleisten und unter Berücksichtigung der geografischen Streuung bestimmter Regionen ist es erforderlich, angesichts der Witterungsbedingungen jeder Saison eine unterschiedliche Frist für die Übersendung der Proben nach ihrer Entnahme an das Laboratorium vorzusehen. Für die Einstufung der Öle ist vorzusehen, dass die Analyseergebnisse mit den Grenzwerten der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91 verglichen werden, bei denen die Reproduktions- und Vergleichsmargen der verwendeten Analysemethoden bereits berücksichtigt sind.
- (8) Um eine Anpassung an die neuen Bestimmungen und die Schaffung der dazu erforderlichen Voraussetzungen zu ermöglichen, ist zur Vermeidung von Handelsstörungen der Beginn der Anwendung der in dieser Verordnung festgelegten Änderungen bis zum 1. September 2002 zu verschieben und eine Ausnahme für Oliven- und Oliventresteröl vorzusehen, das vor diesem Datum für den Einzelhandel abgefüllt wurde.

<sup>(1)</sup> ABl. 172 vom 30.9.1966, S. 3025/66.

<sup>(2)</sup> ABl. L 201 vom 26.7.2001, S. 4.

<sup>(3)</sup> ABl. L 256 vom 7.9.1987, S. 1.

<sup>(4)</sup> ABl. L 97 vom 13.4.2002, S. 1.

<sup>(5)</sup> ABl. L 248 vom 5.9.1991, S. 1.

<sup>(6)</sup> ABl. L 276 vom 19.10.2001, S. 8.

- (9) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Verwaltungsausschusses für Fette und des Ausschusses für den Zollkodex in ihrem jeweiligen Zuständigkeitsbereich —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

### Artikel 1

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

#### 1. In Artikel 2 Absatz 1

a) erhält der dritte Gedankenstrich folgenden Wortlaut:

„— Wachsgehalt nach dem Verfahren des Anhangs IV;“

b) wird ein Gedankenstrich mit folgendem Wortlaut angefügt:

„— Gehalt an aliphatischen Alkoholen nach dem Verfahren des Anhangs XIX.“

#### 2. Artikel 2 Absatz 2 erhält folgende Fassung:

„(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. Artikel 2 Absatz 3 Unterabsatz 2 erhält folgende Fassung:

„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

— in den Monaten Oktober bis Mai spätestens am zehnten Arbeitstag nach der Probenahme und

— in den Monaten Juni bis September spätestens am fünften Arbeitstag nach der Probenahme

zur Analyse in das Laboratorium geschickt.“

#### 4. In Artikel 2 wird folgender Absatz 5 angefügt:

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

5. Die Artikel 3 und 3a werden gestrichen.

6. Artikel 3b wird zu Artikel 3.

7. Artikel 4 Absatz 1 erhält folgende Fassung:

„(1) Zur Beurteilung und Kontrolle der organoleptischen Merkmale durch die einzelstaatlichen Behörden oder ihre Vertreter können die Mitgliedstaaten Prüfergruppen zulassen.

Die Zulassungsbedingungen werden von den Mitgliedstaaten so festgelegt, dass insbesondere gewährleistet ist, dass

— die Bedingungen gemäß Anhang XII Nummer 4 erfüllt sind;

— der Leiter der Prüfergruppe in einem Institut und unter Bedingungen geschult wird, die vom Mitgliedstaat zu diesem Zweck anerkannt sind;

— die Zulassung von den Ergebnissen abhängig gemacht wird, die die Gruppe im Rahmen eines vom Mitgliedstaat jährlich festgelegten Kontrollprogramms erzielt.

Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission die Liste der zugelassenen Prüfergruppen und die nach Maßgabe dieses Absatzes getroffenen Maßnahmen mit.“

8. Artikel 5 wird gestrichen.

9. Die Anhänge werden gemäß dem Anhang dieser Verordnung geändert.

### Artikel 2

Die zusätzliche Anmerkung Nr. 2 zu Kapitel 15 der Kombinierten Nomenklatur in Anhang I der Verordnung (EWG) Nr. 2658/87 wird wie folgt geändert:

1. Im Abschnitt B.I erhält Buchstabe a) folgende Fassung:

„a) Gehalt an Wachs höchstens 300 mg/kg.“

2. Im Abschnitt B.I erhält Buchstabe g) Nummer 4 folgende Fassung:

„4. organoleptische Merkmale mit einem Fehlermedian über 6 gemäß Anhang XII der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91.“

3. Im Abschnitt B.II erhält Buchstabe g) folgende Fassung:

„g) organoleptische Merkmale mit einem Fehlermedian über 6 gemäß Anhang XII der Verordnung (EWG) Nr. 2568/91.“

4. Im Abschnitt D erhält Buchstabe b) folgende Fassung:

„b) Gehalt an Erythrodiol und Uvaol über 4,5 %.“

### Artikel 3

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

Bei Oliven- und Oliventresterölen in Abfüllungen für den Einzelhandel findet sie ab 1. September 2002 Anwendung.

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

Brüssel, den 6. Mai 2002

*Für die Kommission*  
Franz FISCHLER  
*Mitglied der Kommission*

---

## ANHANG

1. Im Inhaltsverzeichnis der Anhänge der Verordnung (EG) Nr. 2568/91 wird
  - a) der Titel: Anhang XIV: Zusätzliche Anmerkungen 2, 3, und 4 zu Kapitel 15 der Kombinierten Nomenklatur gestrichen;
  - b) der Titel: Anhang XIX: Bestimmung des Gehalts an aliphatischen Alkoholen angefügt.
2. Anhang I erhält folgende Fassung:

„ANHANG I

MERKMALE VON OLIVENÖLEN

Kategorie	Gehalt an freien Fettsäuren (%) (*)	Peroxidzahl mEq O <sub>2</sub> /kg (*)	Halogenierte Lösungsmittel mg/kg (*) (1)	Wachse mg/kg (**)	Gesättigte Fettsäuren in 2-Stellung der Triglyceride (%)	Stigmastadiene mg/kg (2)	ECN42-Differenz zwischen HPLC-Meßwert und theoretischer Berechnung	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>270</sub> (*)	K <sub>270</sub> nach Behandlung mit Aluminium (3)	Delta-K (*)	Sensorische Prüfung Fehlermedian (Md) (*)	Sensorische Prüfung Fruchtigkeitsmedian (Mf) (*)
1. Natives Olivenöl extra	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Natives Olivenöl	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Gewöhnliches natives Olivenöl	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 6,0 (4)	—
4. Lampantöl	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 300 (5)	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	—	Md > 6	—
5. Raffiniertes Olivenöl	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—	—
6. Olivenöl	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—	—
7. Rohes Oliventresteröl	> 0,5 (**)	—	—	> 350 (6)	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—	—
8. Raffiniertes Oliventresteröl	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—	—
9. Oliventresteröl	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—	—

(1) Höchstgehalt für die Summe aller halogenierten Verbindungen bei Nachweis mittels Elektroneneinfang-Detektor.

Für jede einzelne Verbindung beträgt der Höchstgehalt 0,10 mg/kg.

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

(3) Zur Bestimmung des Vorhandenseins raffinierter Öle muss der Wert K<sub>270</sub> sofern er den Grenzwert für die entsprechende Kategorie überschreitet, nach Behandlung mit Aluminiumoxid bestimmt werden.

(4) Wenn der Fruchtigkeitsmedian gleich 0 ist, darf der Fehlermedian höchstens 2,5 betragen.

(5) Öl mit einem Wachsegehalt zwischen 300 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.

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

Kategorie	Gehalt an						Summe trans-Isomere Ölsäure (%)	Summe trans-Isomere Linol- und Linolensäure (%)	Cholesterin (%)	Brassicasterin (%)	Campesterin (%)	Stigmasterin (%)	Beta-Sitosterin (%) <sup>(1)</sup>	Delta-7-Stigmasterin (%)	Sterine insgesamt (mg/kg)	Erythrodiol und Uvaol (%) <sup>(**)</sup>
	Myristinsäure (%)	Linolensäure (%)	Arachinsäure (%)	Eicosensäure (%)	Behensäure (%)	Lignocerin-säure (%)										
1. Natives Olivenöl extra	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Natives Olivenöl	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Gewöhnliches natives Olivenöl	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
4. Lampantöl	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 <sup>(2)</sup>
5. Raffiniertes Olivenöl	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Olivenöl	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
7. Rohes Oliventresteröl	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 <sup>(3)</sup>
8. Raffiniertes Oliventresteröl	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
9. Oliventresteröl	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

<sup>(1)</sup> Summe aus Delta-5,23-Stigmastadienol, Clerosterin, Beta-Sitosterin, Sitostanol, Delta-5-Avenasterin und Delta-5,24-Stigmastadienol.

<sup>(2)</sup> Öl mit einem Wachsgehalt zwischen 300 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.

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

#### Anmerkungen:

- a) Die Analyseergebnisse müssen bis auf die gleiche Zahl von Stellen hinter dem Komma 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.
- b) Auch wenn nur ein einziges Merkmal nicht mit dem vorgeschriebenen Grenzwert übereinstimmt, muss das Öl einer anderen Kategorie zugeordnet oder als nicht seinen Reinheitskriterien entsprechend erklärt werden.
- c) Die mit Sternchen (\*), gekennzeichneten Ölqualitätsmerkmale bedeuten:  
 — im Falle von Lampantöl, dass die betreffenden Grenzwerte (außer  $K_{232}$ ) nicht alle gleichzeitig erfüllt werden müssen;  
 — im Falle anderer nativer Olivenöle, dass die Nichterfüllung des Grenzwerts auch nur eines einzigen Merkmals eine Umstufung innerhalb der Kategorien der nativen Olivenöle zur Folge hat.
- d) Die mit zwei Sternchen (\*\*) gekennzeichneten Merkmale bedeuten im Fall der betreffenden Oliventresteröle, dass die jeweiligen Grenzwerte nicht alle gleichzeitig erfüllt werden müssen.“

3. Anhang X B erhält folgende Fassung:

„ANHANG X B

**ZUBEREITUNG DER FETTSÄUREMETHYLESTER VON OLIVENÖL UND OLIVENTRESTERÖL**

Zur Zubereitung der Fettsäuremethylester von Olivenöl und Oliventresteröl werden die zwei folgenden Methoden empfohlen:

Methode A: Umesterung mit kalter methanolischer Kaliumhydroxidlösung;

Methode B: Methylierung durch Erhitzen mit methanolischer Natriummethylatlösung und nachfolgender Veresterung in saurem Medium.

Die Wahl der Methode hängt von dem zu bestimmenden Analyseparameter und der betreffenden Ölkategorie ab:

a) Bestimmung der Differenz zwischen dem tatsächlichen und dem theoretischen Triglycerid-Gehalt bei ECN42 ( $\Delta$ ECN42):

— Die Methode A wird bei Ölproben aller Kategorien nach Reinigung über eine Kieselgelsäule angewandt.

b) Bestimmung der Zusammensetzung der Fettsäuren:

— Die Methode A wird bei Ölproben folgender Kategorien direkt angewandt:

— native Olivenöle mit einem Gehalt an freien Fettsäuren unter 3,3 %,

— raffiniertes Olivenöl,

— Olivenöl (Mischung von nativem Olivenöl und raffiniertem Olivenöl),

— raffiniertes Oliventresteröl,

— Oliventresteröl (Mischung von nativem Olivenöl und raffiniertem Oliventresteröl);

— die Methode B wird bei Ölproben folgender Kategorien direkt angewandt:

— natives Olivenöl mit einem Gehalt an freien Fettsäuren über 3,3 %,

— rohes Oliventresteröl.

c) Bestimmung der Fettsäuren von trans-Isomeren:

— Die Methode A wird bei Ölproben folgender Kategorien direkt angewandt:

— native Olivenöle mit einem Gehalt an freien Fettsäuren unter 3,3 %,

— raffiniertes Olivenöl,

— Olivenöl (Mischung von nativem Olivenöl und raffiniertem Olivenöl);

— raffiniertes Oliventresteröl,

— Oliventresteröl (Mischung von nativem Olivenöl und raffiniertem Oliventresteröl);

— die Methode A wird bei Ölproben folgender Kategorien nach Reinigung über eine Kieselgelsäule angewandt:

— natives Olivenöl mit einem Gehalt an freien Fettsäuren über 3,3 %,

— rohes Oliventresteröl.

**REINIGUNG DER ÖLPROBEN**

Die Ölproben werden nötigenfalls über eine Kieselgelsäule mit einem Hexan-Diethylether-Gemisch (87:13 v/v) als Elutionslösung nach der Methode IUPAC 2.507 gereinigt.

Als alternatives Verfahren ist die Festphasenextraktion an Kieselgelkartuschen möglich. In einen Elutionsapparat unter Vakuum eine Kieselgelkartusche (1 g, 6 ml) geben und mit 6 ml Hexan waschen. Das Vakuum unterbrechen, damit die Säule nicht austrocknet. In die Säule eine Lösung von etwa 0,12 g Öl in 0,5 ml Hexan geben und das Vakuum wieder herstellen, bis die Lösung in das Kieselgel eingedrungen ist, dann mit 10 ml Hexan/Diethylether (87:13 v/v) unter Vakuum eluieren. Das gesamte Eluat homogenisieren und in zwei gleiche Teile teilen. Einen Teil an einem Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck bei Zimmertemperatur bis zur Trockne abrotieren. Den Rückstand in 1 ml Heptan lösen. Die Lösung ist nun zur gaschromatographischen Analyse der Fettsäuren bereit. Zur Analyse der Triglyceride mit HPLC gegebenenfalls den übrigen Teil einrotieren und den Rückstand in 1 ml Aceton lösen.

**METHODEN ZUR ZUBEREITUNG DER FETTSÄUREMETHYLESTER**

1. **Methode A: Umesterung mit kalter methanolischer Kaliumhydroxidlösung**

1.1. **Anwendung**

Diese schnelle Methode wird bei Olivenöl und Oliventresteröl mit einem Gehalt an freien Fettsäuren unter 3,3 % angewandt. Die freien Fettsäuren werden durch das Kaliumhydroxid nicht verestert. Die Ethylester der Fettsäuren werden langsamer umgeestert als die Glyceridester und möglicherweise nur teilweise methyliert.

**1.2. Prinzip**

Die Methylester bilden sich durch Umesterung in einer methanolischen Kaliumhydroxidlösung als Zwischenprodukte vor der Verseifung (Nummer 5 der Methode ISO 5509:2000 und der Methode IUPAC 2.301).

**1.3. Reagenzien**

Methanol mit höchstens 0,5 % (m/m) Wassergehalt,

Heptan für die Chromatographie,

Kaliumhydroxid, ca. 2 N methanolische Lösung: 11,2 g Kaliumhydroxid in 100 ml Methanol lösen.

**1.4. Geräte**

5-ml-Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss/PTFE-Dichtung,

graduierte oder automatische Pipetten, 2 und 0,2 ml.

**1.5. Verfahren**

In ein 5-ml-Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss etwa 0,1 g Ölprobe einwiegen, 2 ml Heptan zufügen und schütteln. 0,2 ml der 2 N methanolischen Kaliumhydroxidlösung zugeben, fest verschließen und 30 Sekunden kräftig schütteln. Absetzen lassen, bis sich der obere Teil der Lösung geklärt hat. Die obere Phase (mit den Methylestern) abdekantieren. Die Heptanlösung ist bereit zur Injektion in den Chromatographen. Es wird empfohlen, die Lösung bis zur chromatographischen Analyse im Kühlschrank und nicht länger als 12 Stunden aufzubewahren.

**2. Methode B: Methylierung durch Erhitzen mit methanolischer Natriummethylatlösung und nachfolgender Veresterung in saurem Medium****2.1. Anwendung**

Diese Methode wird bei Olivenöl und Oliventresteröl mit einem Gehalt an freien Fettsäuren über 3,3 % angewandt.

**2.2. Prinzip**

Neutralisierung der freien Fettsäuren und alkalische Methanolyse der Glyceride mit nachfolgender Veresterung der Fettsäuren in saurem Medium (Nummer 4.2 der Methode IUPAC 2.301).

**2.3. Reagenzien**

— Heptan für die Chromatographie,

— Methanol mit höchstens 0,05 % (m/m) Wassergehalt,

— Natriummethylat, 0,2 N methanolische Lösung: 5 g Natrium in 1 000 ml Methanol lösen (kann aus käuflichen Lösungen hergestellt werden),

— Phenolphthalein, 0,2%ige methanolische Lösung,

— Schwefelsäure, 1 N in methanolischer Lösung: 3 ml 96%ige Schwefelsäure in 100 ml Methanol geben,

— gesättigte Natriumchloridlösung in Wasser.

**2.4. Geräte**

— 50-ml-Stehkolben, langer enger Hals mit Schliff,

— Rückflusskühler, Mantellänge 1 m mit Schliff, passend zum Stehkolben,

— Siedesteine/-perlen,

— Glastrichter.

**2.5. Verfahren**

In einen 50-ml-Stehkolben mit Schliff 0,25 g Ölprobe geben. Mit Hilfe eines Trichters 10 ml der 0,2 N methanolischen Natriummethylatlösung und Siedeperlen hinzufügen. Den Rückflusskühler anbringen, schütteln und zum Sieden bringen. Die Lösung muss nach etwa 10 Minuten klar werden, die Reaktion ist praktisch nach 15 Minuten abgeschlossen. Den Kolben von der Wärmequelle nehmen, die Beendigung des Rückflusses abwarten, den Kühler abnehmen und zwei Tropfen Phenolphthaleinlösung zugeben. Einige ml 1N Schwefelsäure in die Lösung geben, bis sie farblos wird, und dann nochmals 1 ml zufügen. Den Kühler anschließen und erneut zum Sieden bringen. Nach etwa 20 Minuten den Kolben von der Wärmequelle nehmen und unter fließendem Wasser abkühlen. Den Kühler abnehmen, 20 ml gesättigte Natriumchloridlösung zugeben und schütteln. 5 ml Heptan zufügen, den Kolben verschließen und 15 Sekunden kräftig schütteln.



Bis zur vollständigen Trennung der beiden Phasen absetzen lassen. Nochmals einen Teil der gesättigten Natriumchloridlösung zugeben, bis die wässrige Phase den unteren Rand des Kolbenhalses erreicht. Die obere Schicht, die sich im Hals des Kolbens befindet, enthält die Methylester. Die Lösung ist bereit zum Einspritzen in den Gaschromatographen.

**Vorsicht:** Die Methylierung mit Methode B unter eingeschaltetem Abzug durchführen!

## 2.6. Alternativen zur Methylierung nach Methode B

### 2.6.1. Methode C

#### 2.6.1.1. Prinzip

Das zu analysierende Fett wird mit methanolischer Salzsäurelösung in einer verschlossenen Ampulle bei 100 °C umgesetzt.

#### 2.6.1.2. Geräte

- Dickwandige Glasampulle mit ca. 5 ml Inhalt (Länge 40-45 mm, Durchmesser 14-16 mm),
- 1- und 2-ml-Messpipetten.

#### 2.6.1.3. Reagenzien

Salzsäurelösung in 2 % Methanol, aus gasförmiger Salzsäure und wasserfreiem Methanol hergestellt (Anmerkung 1),

Hexan für die Chromatografie.

Anmerkung 1: Dazu können käufliche Salzsäure-Methanolösungen verwendet werden. Im Labor lassen sich kleinere Mengen gasförmiger Salzsäure leicht herstellen, indem man in eine käufliche Salzsäure ( $p = 1,18$ ) etwas konzentrierte Schwefelsäure ( $p = 1,84$ ) eintropfen lässt. Da die freigesetzte Salzsäure sehr schnell vom Methanol absorbiert wird, sind beim Lösen die nötigen Vorkehrungen zu treffen (z. B. indem man das Gas umgekehrt durch einen kleinen Trichter einleitet, dessen Rand die Oberfläche des Methanols berührt). Größere Mengen Salzsäure-Methanolösung lassen sich auf Vorrat herstellen, da sie in dunklen Glasflaschen mit Glasstöpsel haltbar ist. Dieses Reagenz kann auch durch Lösung von Acetylchlorid in wasserfreiem Methanol hergestellt werden.

#### 2.6.1.4. Verfahren

- In die Ampulle 0,2 g der über Natriumsulfat getrockneten und filtrierten Ölprobe geben, 2 ml der Salzsäure-Methanolösung zufügen und die Ampulle schließen.
- Die Ampulle 40 Minuten in ein Wasserbad von 100 °C tauchen.
- Unter fließendem Wasser abkühlen, öffnen, 2 ml destilliertes Wasser und 1 ml Hexan zugeben.
- Zentrifugieren und die gebrauchsfertige Hexanphase abnehmen.

### 2.6.2. Methode D

#### 2.6.2.1. Prinzip

Das zu analysierende Fett wird unter Rückfluss mit einem Gemisch aus Methanol, Hexan und Schwefelsäure erhitzt. Die dabei entstehenden Methylester werden mit Petrolether extrahiert.

#### 2.6.2.2. Geräte

- Reaktionsgefäß, ca. 20 ml Inhalt, Rückflusskühler von ca. 1 m Länge mit Schliff,
- 5-ml-Messpipette,
- 50-ml-Scheidetrichter,
- 10- und 25-ml-Messbecher,
- 15-ml-Reaktionsgefäß mit konischem Boden.

#### 2.6.2.3. Reagenzien

- Methylierungsreagenz: wasserfreies Methanol, Hexan und Schwefelsäure ( $p=1,84$ ) im Verhältnis 75:25:1 (v/v/v),

- Petrolether, 40-60 °C,
- wasserfreies Natriumsulfat.

#### 2.6.2.4. Verfahren

In das 20-ml-Reaktionsgefäß 0,1 g Ölprobe geben und 5 ml Methylierungsreagenz zufügen.

Rückflusskühler anbringen und im siedenden Wasserbad 30 Minuten erhitzen (Anmerkung 2).

Die Mischung quantitativ mit 10 ml destilliertem Wasser und 10 ml Petrolether in einen 50-ml-Scheidetrichter umfüllen. Kräftig schütteln und die Phasen absetzen lassen. Die wässrige Schicht ablaufen lassen und die Petroletherschicht zweimal mit je 20 ml destilliertem Wasser waschen. In den Scheidetrichter eine kleine Menge wasserfreies Natriumsulfat geben, schütteln, einige Minuten stehen lassen und filtrieren. Das Filtrat in das 15-ml-Reaktionsgefäß mit konischem Boden geben.

Das Lösungsmittel im Wasserbad unter Einleiten von Stickstoff abdampfen.

Anmerkung 2: Zur Kontrolle des Siedevorgangs einen Glasstab in das Reaktionsgefäß stellen und die Temperatur nicht über 90 °C ansteigen lassen.

### 3. **Präzisionsparameter**

Die statistische Auswertung der Präzision der Methoden A und B wurde vom Internationalen Olivenölrat in seiner Methode COI/T.20/Dok.Nr.24 veröffentlicht.

## EMPFEHLUNGEN ZUR GASCHROMATOGRAPHISCHEN ANALYSE DER FETTSÄUREESTER VON OLIVENÖL UND OLIVENTRESTERÖL

### 1. **Verfahren**

Die gaschromatographische Analyse der Fettsäureester in Heptan erfolgt nach der Norm ISO 5508 mit einer Kapillarsäule (Länge 50 m, Innendurchmesser 0,25 oder 0,32 mm), beschichtet mit einer Cyanopropylsilykonphase, die zur Bestimmung der trans-Isomere von Fettsäuren angegeben ist (COI/T.20/Dok.Nr.17).

Schaubild 1 zeigt das typische chromatographische Profil eines Oliventrestereöls mit Fettsäuremethyl- und -ethylestern sowie trans-Isomeren von Methylestern.

### 2. **Berechnungen**

#### 2.1. Bei der Berechnung der Fettsäurezusammensetzung und $\Delta$ ECN42 werden alle folgenden Fettsäuren berücksichtigt:

Myristinsäure (C14:0);

Palmititinsäure (C16:0), Summe der den Methyl- und Ethylestern entsprechenden Peakflächen;

Palmitoleinsäure (C16:1), Summe der den  $\omega$ 9- und  $\omega$ 7-Isomeren der Methylester entsprechenden Peakflächen;

Heptadecansäure/Margarinsäure (C17:0);

Heptadecensäure (C17:1);

Stearinsäure (C18:0);

Ölsäure (C18:1), Summe der den  $\omega$ 9- und  $\omega$ 7-Isomeren der Methylester, den Ethylestern und den trans-Isomeren der Methylester entsprechenden Peakflächen;

Linolsäure (C18:2), Summe der den Methyl- und Ethylestern und den trans-Isomeren der Methylester entsprechenden Peakflächen;

Arachinsäure (C20:0);

Linolensäure (C18:3), Summe der Peakflächen der Methylester und der trans-Isomere der Methylester;

Eicosensäure (C20:1);

Behensäure (C22:0);

Lignocerinsäure (C24:0).

Bei der Berechnung der Gesamtfläche bleibt das Squalen unberücksichtigt.

#### 2.2. Zur Berechnung von trans-C18:1 wird der den Methylestern dieser Fettsäure entsprechende Peak herangezogen. Für die Summe [trans-C18:2 + trans-C18:3] werden alle den trans-Isomeren dieser beiden Fettsäuren entsprechenden Peaks addiert. Die Gesamtfläche berechnet sich aus allen unter 2.1 genannten Peaks (s. COI/T.20/Dok.Nr.17).

Der Prozentsatz der einzelnen Fettsäuren wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% X = (\text{Fläche } X \times 100) / (\text{Gesamtfläche})$$

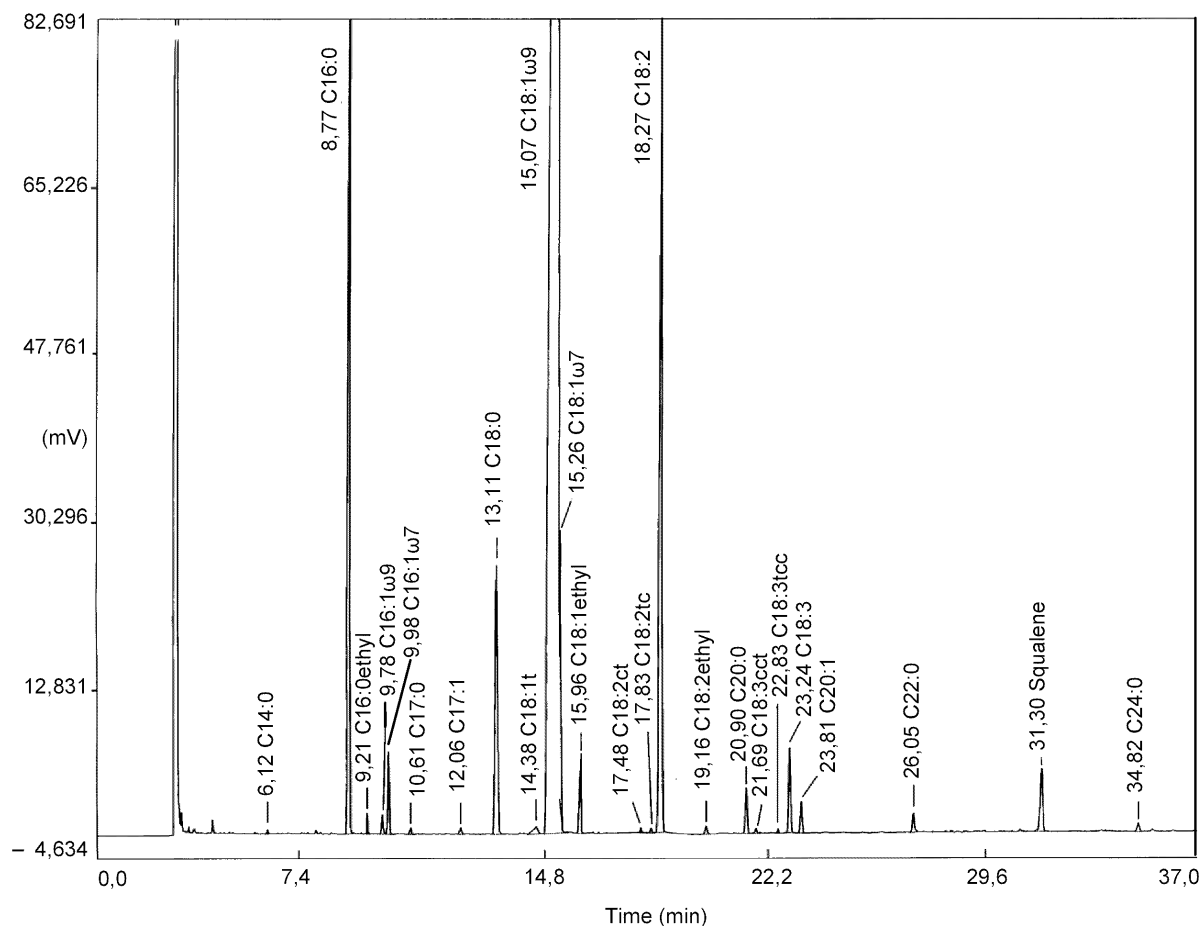


Schaubild 1: Gaschromatogramm eines Oliventresteröls nach der Methode der Kaltmethylierung. Die Peaks entsprechen den Methylestern, soweit nichts anderes angegeben ist.

4. Anhang XII erhält folgende Fassung:

#### „ANHANG XII

### ORGANOLEPTISCHE PRÜFUNG VON NATIVEN OLIVENÖLEN

#### 1. GEGENSTAND UND ANWENDUNGSBEREICH

Diese Verfahrensvorschrift dient der Festlegung der Kriterien für die Bewertung der organoleptischen Merkmale von nativen Olivenölen im Sinne von Nummer 1 des Anhangs der Verordnung 136/66/EWG und beschreibt die Methode für ihre diesbezügliche Einstufung.

Die Verfahrensvorschrift gilt nur für die Einstufung nativer Olivenöle entsprechend ihrer Fruchtigkeit und dem Umfang der Mängel, wie sie von einer Gruppe ausgewählter und geschulter Prüfer gemäß Nummer 4 bestimmt werden.

#### 2. ALLGEMEINES

Für die allgemeinen Grundbegriffe, den Prüfraum, die grundlegende Verfahrensweise und das Prüfglas wird empfohlen, sich an die entsprechenden Vorgaben des Internationalen Olivenölrates zu halten.

#### 3. SPEZIFISCHE BEGRIFFE

##### 3.1. Positive Attribute

*Fruchtig*: Gesamtheit der je Olivensorte und Merkmale eines Öls unmittelbar oder retronasal wahrgenommenen Geruchsempfindungen aus gesunden und frischen, grünen oder reifen Früchten.

*Bitter*: typischer Geschmack von Öl aus grünen oder grünlichen Oliven.

*Scharf*: taktil empfundenes Prickeln, typisch für Öle, die zu Beginn des Wirtschaftsjahres hauptsächlich aus noch grünen Oliven gewonnen werden.

### 3.2. Negative Attribute

*Stichig*: typisches Flavour bei Öl aus Oliven, die sich in einem Zustand fortgeschrittener anaerober Gärung befinden.

*Modrig-feucht*: typisches Flavour bei Öl aus Oliven mit Schimmel- und Hefepilzbefall wegen mehrtägiger Lagerung der Früchte unter feuchten Bedingungen.

*Schlammig*: typisches Flavour bei Öl, das mit Dekantier-,Schlämmen' in Becken und Fässern in Kontakt war.

*Wein- oder essigartig*: typisches Flavour bei bestimmten Ölen, an Wein oder Essig erinnernd und in erster Linie bedingt durch einen Gärungsprozess der Oliven, bei dem Essigsäure, Ethylacetat und Ethanol entstehen.

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

*Ranzig*: Flavour von oxidierten Ölen.

*Brandig oder erhitzt*: typisches Flavour bei Ölen aufgrund einer übermäßigen und/oder zu langen Erwärmung bei der Gewinnung und insbesondere durch unsachgemäße Wärmebehandlung bei Herstellung der Paste.

*Heuartig-holz*: typisches Flavour bei bestimmten Ölen, das von trockenen Oliven herrührt.

*Roh*: Bezeichnung für Öl, das im Mund einen dickflüssigen, pastösen Sinneseindruck hinterlässt.

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

*Fruchtwasserartig*: Flavour bei Ölen, das von längerem Kontakt mit Fruchtwasser herrührt.

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

*Espartograsartig*: typisches Flavour bei Ölen aus Oliven, die mit Hilfe neuer Espartograskörbe gepresst wurden. Dieses Aroma kann in verschiedenen Nuancen auftreten, je nachdem, ob Körbe aus grünem oder trockenem Espartogras verwendet wurden.

*Erdig*: Flavour bei Ölen, das von anhaftender Erde oder Schlamm ungewaschener Oliven herrührt.

*Wurmstichig*: Flavour bei Ölen aus Oliven mit starkem Befall von Larven der Olivenfliege (*Bactrocera Oleae*)

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

### 4. PRÜFERGRUPPE

Die Prüfergruppe wird vom Mitgliedstaat benannt und setzt sich aus einem Prüfungsleiter und acht bis zwölf sensorischen Prüfern zusammen. Für das Wirtschaftsjahr 2001/02 darf die Zahl der Prüfer jedoch weniger als acht betragen.

Der Prüfungsleiter muss über eine solide Ausbildungsgrundlage und über Sach- und Fachkenntnisse auf dem Gebiet der verschiedenen Öltypen verfügen. Er ist verantwortlich für die Gruppe, ihre Organisation und Tätigkeit, die Vorbereitung, Verschlüsselung und Aufmachung der Proben für die Prüfer sowie für die Erfassung und statistische Auswertung der Daten.

Der Prüfungsleiter wählt die Prüfer aus, überwacht ihre Schulung und kontrolliert ihre Prüfungsleistung um sicherzustellen, dass ihre Urteilsfähigkeit erhalten bleibt.

Die für die organoleptische Bewertung von Olivenöl zuständigen sensorischen Prüfer werden nach ihrer Eignung ausgewählt und geschult, ähnliche Proben voneinander zu unterscheiden und so dem Leitfaden des Internationalen Olivenölrates für die Auswahl, Schulung und Kontrolle qualifizierter sensorischer Prüfer von nativem Olivenöl zu entsprechen.

Die Prüfergruppen müssen sich verpflichten, an den auf nationaler, gemeinschaftlicher oder internationaler Ebene vorgesehenen organoleptischen Bewertungen zur regelmäßigen Kontrolle und zur Harmonisierung der Wahrnehmungskriterien teilzunehmen. Sie sind weiter verpflichtet, dem betreffenden Mitgliedstaat jährlich alle Auskünfte über ihre Zusammensetzung und die Zahl der in ihrer Funktion als zugelassene Prüfergruppe durchgeführten Bewertungen mitzuteilen.

### 5. VERFAHREN FÜR DIE ORGANOLEPTISCHE BEWERTUNG UND EINSTUFUNG VON OLIVENÖL

#### 5.1. Verwendung der Profilbeschreibung durch den Prüfer

Die zu verwendende Profilbeschreibung ist in Anlage A dieser Verfahrensvorschrift festgelegt.

Jeder zur Prüfergruppe gehörende Prüfer muss das im Prüfglas befindliche Öl zunächst riechen und dann verkosten<sup>(1)</sup>, um einen Gesamtsinneseindruck aus Geruchs-, Geschmacks-, taktilen und kinästhetischen Empfindungen gewinnen und analysieren zu können. Die Intensität der Wahrnehmung jedes negativen und positiven Attributs ist in der Profilbeschreibung einzutragen.

Werden negative Attribute wahrgenommen, die nicht in der Profilbeschreibung vermerkt sind, so sind diese unter Verwendung der Begriffe gemäß Nummer 3.2 dieser Verfahrensvorschrift, mit denen sie am zutreffendsten beschrieben werden, in der Spalte ‚Sonstige‘ anzugeben.

#### 5.2. **Verwendung der Angaben durch den Prüfungsleiter**

Der Prüfungsleiter sammelt die ausgefüllten Profilbeschreibungen der einzelnen Prüfer, um die 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 kann die Angaben der einzelnen Prüfer nach der Methode zur statistischen Berechnung des Medians gemäß Anlage B in einer elektronischen Datenbank erfassen. Die Daten für eine Probe werden anhand einer Matrix aus 10 Spalten, die jeweils den 10 sensorischen Attributen entsprechen, und n Zeilen erfasst, die n Prüfern der Prüfergruppe entsprechen.

Wird in der Spalte ‚Sonstige‘ von mindestens 50 % der Prüfer ein negatives Attribut eingetragen, so muss der Prüfungsleiter den Median dieses Attributs berechnen und die entsprechende Einstufung vornehmen.

Im Falle von Analysen im Rahmen von Konformitätskontrollen oder Gegengutachten muss der Prüfungsleiter die organoleptische Bewertung des Öls im Abstand von mindestens einem Tag dreimal vornehmen lassen; der Median der Attribute wird anhand der Gesamtangaben der Profilbeschreibung der drei Versuche berechnet.

#### 5.3. **Einstufung der Öle**

Das Öl wird entsprechend dem Median der festgestellten Mängel und dem Median des Attributs ‚fruchtig‘ unter den nachstehenden Bezeichnungen eingestuft. Unter Median der Mängel wird der Median des am intensivsten wahrgenommenen negativen Attributs verstanden. Der Wert des robusten Variationskoeffizienten für dieses negative Attribut darf höchstens 20 % betragen.

- 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 und kleiner als oder gleich 2,5 und der Median des Attributs ‚fruchtig‘ ist größer als 0.
- c) *Gewöhnliches natives Olivenöl*: der Median der Mängel ist größer als 2,5 und kleiner als oder gleich 6,0 oder der Median der Mängel ist kleiner als oder gleich 2,5 und der Median des Attributs ‚fruchtig‘ ist gleich 0.
- d) *Natives Lampantöl*: der Median der Mängel ist größer als 6,0.

Ab 1. November 2003 werden die Kategorien c) und d) jedoch durch folgende Kategorie ersetzt:

- c) *Lampantöl*: der Median der Mängel ist größer als 2,5 oder der Median der Mängel ist kleiner oder gleich 2,5 und der Median des Attributs ‚fruchtig‘ ist gleich 0.

#### 5.4. **Sonderfälle**

Liegt der Median für ein anderes positives Attribut als ‚fruchtig‘ über 5,0, so vermerkt der Prüfungsleiter dies auf der Analysebescheinigung des Öls.

<sup>(1)</sup> Der Prüfer kann vom Verkosten absehen, wenn er einige ausgeprägte negative Attribute feststellt; er vermerkt diese außergewöhnlichen Umstände in der Profilbeschreibung.



## ANLAGE B

## 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 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 anderen Definition ist der Median das 50. Perzentil einer Zahlenverteilung in steigender Reihenfolge. Mit anderen Worten, der Median entspricht bei einer ungeraden Zahl von Werten in nach ihrer Größe geordneten Folge dem zentralen Wert und bei einer geraden Zahl von Werten dem Durchschnittswert der beiden zentralen Werte.

**Robuste Standardabweichung**

$$S = \frac{1,25 \text{ IQR}}{1,35 \sqrt{N}}$$

Um einen zuverlässigen Schätzwert für die Variabilität zu erhalten, die sich um den Median bildet, ist der Schätzwert der robusten Standardabweichung nach Stuart und Kendall heranzuziehen. Die Formel der asymptotischen Standardabweichung S hängt ab von N und IQR. N ist die Zahl der Beobachtungen und IQR der Quartilabstand, d. h. der robuste Schätzwert der Variabilität der betreffenden Angaben (der Quartilabstand umfasst genau 50 % der Fälle einer beliebigen Wahrscheinlichkeitsverteilung). Zur Berechnung des Quartilabstands wird die Dimension der Abweichung zwischen dem 75. und 25. Perzentil berechnet.

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

Das Perzentil ist der Wert  $X_{pc}$ , gekennzeichnet durch die Tatsache, dass die Wahrscheinlichkeit (P), dass die Werte der Verteilung (X) unter  $X_{pc}$  liegen, niedriger als ein bestimmtes Hunderstel 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 genannte Hunderstel ist oder ihm entspricht. Das Hunderstel gibt die Fraktion der in Frage kommenden Verteilung an. Im Fall des Medians entspricht sie 50/100.

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

Mit anderen Worten, das Perzentil ist der Verteilungswert, der einem bestimmten Bereich entspricht, der unter Zugrundelegung der Verteilungs- oder Dichtekurve bestimmt wird. Beispiel: das 25. Perzentil ist der Verteilungswert, der einem Bereich von 0,25 oder 25/100 entspricht.

**Robuster Variationskoeffizient in %**

$$\text{CVR} = \frac{S}{Me} 100$$

Der CVR ist eine reine Zahl, d. h. ein Wert ohne Dimension, die den Prozentsatz der Variabilität der analysierten Zahlenreihe gemessen am Median Me angibt; daher ist dieser Koeffizient zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der Mitglieder der Prüfergruppe besonders geeignet.

**Vertrauensintervalle bei 95 % für den Median**

Das Vertrauensintervall (I.C.) von 95 % (der Wert des Fehlers erster Art entspricht 0,05 bzw. 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 dieses Intervall das Variabilitätsintervall des Versuchs unter den vorgesehenen operationellen Bedingungen an, in der Annahme, dass der Versuch mehrmals wiederholt werden könnte. Das Intervall ist, wie der CVR, nützlich zur Bewertung der Zuverlässigkeit des Versuchs.

$$\text{I. C. Sup.} = Me + (c.S)$$

$$\text{I. C. Inf.} = Me - (c.S)$$

wobei c, bei einem Vertrauensintervall von 0,95, einem Wert von 1,96 entspricht.

Die Einstufung erfolgt durch Vergleich der Medianwerte mit den gemäß Nummer 5.3 der Verfahrensvorschrift bestimmten Bezugsintervallen. Eine entsprechende Computer-Software gestattet eine visuelle Einstufung in tabellarischer oder grafischer Form.“

5. Anhang XIV wird gestrichen.
6. Folgender Anhang XIX wird angefügt:

„ANHANG XIX

**BESTIMMUNG DES GEHALTS AN ALIPHATISCHEN ALKOHOLEN MIT DER KAPILLAR-GASCHROMATOGRAPHIE**

1. ANWENDUNGSBEREICH

Die Methode beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Zusammensetzung und des Gehalts an aliphatischen Alkoholen.

2. PRINZIP DER METHODE

Das Fett wird mit 1-Eicosanol als internem Standard versetzt, mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung verseift und das Unverseifbare mit Ethylether extrahiert. Die Alkoholfraktion wird dünnschichtchromatographisch über basische Kieselgelplatten vom Unverseifbaren abgetrennt. Die aus dem Kieselgel isolierten Alkohole werden in Trimethylsilylether überführt und mit Hilfe der Kapillar-Gaschromatographie untersucht.

3. GERÄTE

- 3.1. Kolben, 250 ml, mit Rückflusskühler und Schliffstopfen,
- 3.2. 500-ml-Scheidetrichter,
- 3.3. Kolben, 250 ml,
- 3.4. komplette Apparatur für die Dünnschichtchromatographie mit Glasplatten 20 × 20 cm,
- 3.5. UV-Lampe, Wellenlänge 366 oder 254 nm,
- 3.6. Mikroliterspritzen, 100 und 500 µl,
- 3.7. Glasfiltertiegel mit Porenfilter G 3 (Porosität 15-40 µm), etwa 2 cm Durchmesser, 5 cm Höhe, mit geeignetem Anschlussstück für die Vakuumfiltration und Schliffmuffe 12/21,
- 3.8. Vakuumflasche, 50 ml, mit Schliffmuffe 12/21, für Glasfiltertiegel (3.7),
- 3.9. 10 ml-Röhrchen mit konischem Boden und dicht schließendem Stopfen,
- 3.10. Gaschromatograph, geeignet für die Verwendung von Kapillarsäulen, mit Splitsystem, bestehend aus:
  - 3.10.1. thermostatisierbarem Säulenofen, einstellbar auf die gewünschte Temperatur mit einer Genauigkeit von ± 1 °C,
  - 3.10.2. temperaturregelbarer Injektionseinrichtung mit Verdampfer aus persilanisiertem Glas,
  - 3.10.3. Flammenionisations-Detektor mit Verstärker,
  - 3.10.4. Integrator mit Schreiber, an Verstärker zu koppeln, Reaktionszeit maximal 1 Sekunde, variabler Papiervorschub,
- 3.11. Kapillarsäule aus Glas oder fused silica, 20-30 m Länge, 0,25-0,32 mm Innendurchmesser, Innenwand belegt mit SE-52 oder SE-54 oder einer gleichwertigen stationären Phase, Schichtdicke 0,10-0,30 µm,
- 3.12. Mikroliterspritze für die Gaschromatographie, 10 µl, mit gehärteter Nadel,
- 3.13. Präzisionswaage mit einer Empfindlichkeit von 1 mg (Anzeigegenauigkeit 0,1 mg).

4. REAGENZIEN

- 4.1. Kaliumhydroxid, ethanolische Lösung 2 N: 130 g Kaliumhydroxid (Titer mindestens 85 %) in 200 ml destilliertem Wasser unter Kühlen lösen und mit Ethanol auf 1 Liter auffüllen. Die Lösung ist in gut verschlossenen braunen Glasflaschen aufzubewahren.
- 4.2. Ethylether, analysenrein,
- 4.3. wasserfreies Natriumsulfat, analysenrein,



- 4.4. Kieselgelbeschichtete Glasplatten ohne Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0,25 mm (gebrauchsfertig im Handel erhältlich),
- 4.5. Kaliumhydroxid, ethanolische Lösung 0,2 N: 13 g Kaliumhydroxid in 20 ml destilliertem Wasser lösen und mit Ethanol auf 1 l auffüllen,
- 4.6. Benzol für die Chromatographie (siehe 5.2.2),
- 4.7. Aceton für die Chromatographie (siehe 5.2.2),
- 4.8. Hexan für die Chromatographie (siehe 5.2.2),
- 4.9. Ethylether für die Chromatographie (siehe 5.2.2),
- 4.10. Chloroform, analysenrein,
- 4.11. Referenzlösung für die Dünnschichtchromatographie: Cholesterin oder Phytosterole, 5%ige Lösung in Chloroform,
- 4.12. 2',7'-Dichlorfluorescein, 0,2%ige ethanolische Lösung, leicht alkalisch durch Zusatz einiger Tropfen alkoholischer 2-N-Kaliumhydroxid-Lösung,
- 4.13. wasserfreies Pyridin für die Chromatographie,
- 4.14. Hexamethyldisilazan,
- 4.15. Trimethylchlorsilan,
- 4.16. Standardlösung der Trimethylsilylether der aliphatischen Alkohole von C<sub>20</sub> bis C<sub>28</sub>, unmittelbar vor Gebrauch ansetzen aus einer Mischung der reinen Alkohole,
- 4.17. 1-Eicosanol, 0,1%ige Lösung (m/V) in Chloroform (interner Standard),
- 4.18. Trägergas: Wasserstoff oder Helium, rein, für die Gaschromatographie,
- 4.19. Hilfsgase: Stickstoff, rein, für die Gaschromatographie.

## 5. VERFAHREN

### 5.1. Herstellung des Unverseifbaren

- 5.1.1. Mit einer 500-Mikroliterspritze so viel von der 0,1%igen 1-Eicosanollösung in Chloroform (4.17) in den 250-ml-Kolben geben, dass die Menge an 1-Eicosanol etwa 10 % des Gehalts an aliphatischen Alkoholen des zur Analyse verwandten aliquoten Teils der Probe entspricht. So werden z. B. für 5 g Olivenöl 250 µl und für Oliventresteröl 1 500 µl der 0,1%igen 1-Eicosanollösung benötigt.

Die Probe im Stickstoffstrom bis zur Trockne eindampfen. In den gleichen Kolben genau 5 g der trockenen und filtrierten Probe einwiegen.

- 5.1.2. Die Probe bei aufgesetztem Rückflusskühler mit 50 ml 2-N-Ethanol-Kaliumhydroxidlösung versetzen, auf dem Wasserbad erhitzen und unter kräftigem Schütteln und schwachem Sieden verseifen (wobei die Lösung klar wird). Die Probe weitere 20 Minuten am Sieden halten und dann durch den Rückflusskühler mit 50 ml destilliertem Wasser versetzen; Rückflusskühler entfernen und den Kolben auf etwa 30 °C abkühlen.
- 5.1.3. Den Kolbeninhalt quantitativ in einen 500-ml-Scheidetrichter überführen, wobei mehrfach mit insgesamt etwa 50 ml destilliertem Wasser nachgespült wird. Die Probe mit etwa 80 ml Ethylether versetzen, 30 Sekunden kräftig schütteln und absetzen lassen (Anmerkung 1).

Die wässrige Phase in einen anderen Scheidetrichter ablassen und dann noch zweimal nach dem gleichen Verfahren mit jeweils 60-70 ml Ethylether extrahieren.

Anmerkung 1: Etwaige Emulsionen können mit Hilfe einer Waschflasche durch Zusatz kleiner Mengen Ethylalkohol oder Methylalkohol zerstört werden.

- 5.1.4. Die Etherauszüge in einem Scheidetrichter vereinigen und mehrmals mit jeweils 50 ml destilliertem Wasser waschen, bis das Waschwasser neutral reagiert.

Das Waschwasser ablassen, die Etherphase mit wasserfreiem Natriumsulfat trocknen und über wasserfreiem Natriumsulfat in einen zuvor gewogenen 250-ml-Kolben filtrieren. Scheidetrichter und Filter mit kleinen Mengen Ethylether nachspülen.

- 5.1.5. Den Ether bis auf wenige Milliliter abdestillieren, den Rückstand unter leichtem Vakuum oder im Stickstoffstrom trocknen, etwa 1/4 Stunde im Trockenschrank bei 100 °C nachtrocknen, im Exsikkator abkühlen lassen und wiegen.

## 5.2. Abtrennen der Alkoholfraktion

- 5.2.1. Herstellung der basischen Platten: Die Kieselgelplatten (4.4) vollständig ca. 10 Sekunden lang in eine ethanolsche 0,2-N-Kaliumhydroxidlösung (4.5) eintauchen, dann unter einem Abzug 2 Stunden trocknen lassen, anschließend noch für 1 Stunde bei 100 °C in den Trockenschrank gestellt.

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

Anmerkung 2: Bei Verwendung von basischen Kieselgelplatten zur Abtrennung der Alkoholfraktion erübrigt sich die Behandlung des Unverseifbaren mit Aluminiumoxid. Auf diese Weise bleiben sämtliche sauren Verbindungen (Fettsäuren und andere) an der Startlinie. So erhält man eine saubere Trennung der Zone der aliphatischen Alkohole und Terpenalkohole von den Sterinen.

- 5.2.2. Die Entwicklerkammer bis zu einer Höhe von etwa 1 cm mit einem Hexan/Ethylether-Gemisch 65:35 (V/V) beschicken (\*).

Die Kammer mit einem geeigneten Deckel verschließen und mindestens eine halbe Stunde 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 3: Um gut reproduzierbare Trennungen zu erzielen, ist das Gemisch jedesmal frisch anzusetzen.

- 5.2.3. Von einer 5%igen Lösung des Unverseifbaren (5.1.5) in Chloroform mit einer 100- $\mu$ l-Spritze 0,3 ml als durchgehenden, gleichmäßigen Strich 2 cm vom unteren Plattenrand entfernt auf die Dünnschichtplatte (5.2.1) auftragen. In der Verlängerung der Startlinie werden am Rande 2-3  $\mu$ l der Standardlösung der aliphatischen Alkohole (4.11) aufgetragen, um die Alkoholzone nach der Entwicklung identifizieren zu können.

- 5.2.4. Die Platte in die nach 5.2.2 vorbereitete Entwicklerkammer stellen. Die Temperatur der Umgebung sollte 15-20 °C 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 trocknen lassen.

- 5.2.5. Die Platte vorsichtig und gleichmäßig mit 2',7'-Dichlorfluoresceinlösung besprühen. Die Lage der Zone der aliphatischen Alkohole mit Hilfe des Flecks der Referenzlösung bestimmen. Die Zone der aliphatischen Alkohole und die Zone der unmittelbar darüber liegenden Terpenalkohole werden mit einem schwarzen Stift umrandet.

Anmerkung 4: Da unter den Bedingungen dieses Verfahrens die Terpenalkohole beträchtliche Mengen an aliphatischen Alkoholen enthalten, müssen beide Zonen zusammen erfasst werden.

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

Den Rückstand im Glasfiltertiegel dreimal mit je 10 ml Ethylether 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 (3.9) überführen. Durch vorsichtiges Erhitzen unter einem schwachen Stickstoffstrom bis zur Trockne eindampfen. Mit einigen Tropfen Aceton versetzen, wieder bis zur Trockne eindampfen, etwa 10 Minuten im Trockenschrank auf 105 °C erhitzen, anschließend im Exsikkator abkühlen lassen und wiegen.

Der Rückstand in dem Probengläschen enthält die Fraktion der aliphatischen Alkohole.

## 5.3. Herstellung der Trimethylsilylether (TMSE)

- 5.3.1. Dem Probengläschen mit der Fraktion der aliphatischen Alkohole je Milligramm aliphatischem Alkohol 50  $\mu$ l Silanisierungsreagenz, bestehend aus einem Gemisch aus Pyridin, Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorosilan im Verhältnis 9:3:1 (V/V/V) (Anmerkung 5) zusetzen. Dabei darf es nicht zur Aufnahme von Wasser kommen (Anmerkung 6).

Anmerkung 5: Gebrauchsfertige Lösungen sind im Handel erhältlich; daneben gibt es auch andere Silanisierungsreagenzien, wie z. B. N,O-bis-Trimethylsilyltrifluoracetamid + 1 % Trimethylchlorosilan, das mit gleichen Teilen wasserfreiem Pyridin gemischt werden muss.

Anmerkung 6: Die Beobachtung einer leichten Opaleszenz ist normal und bedeutet keine Störung. Die Bildung eines weißen Niederschlags oder der Eindruck einer Rosafärbung sind Anzeichen der Anwesenheit von Feuchtigkeit oder der Zersetzung des Reagens. In diesem Fall ist der Test zu wiederholen.

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

(\*) Insbesondere in diesem Fall ist zur sauberen Trennung der Zonen ein Benzol/Aceton-Gemisch 95:5 (V/V) als Elutionsmittel zu verwenden.

#### 5.4. Gaschromatographische Analyse

##### 5.4.1. Vorbereiten, Einfahren der Säule

5.4.1.1. Die Säule in den Gaschromatographen einsetzen, wobei das Einlassteil an den mit dem Trennsystem verbundenen Injektor und das Auslassteil an den Detektor angeschlossen wird. Überprüfung des Gaschromatographen auf Dichtigkeit der Gasleitungen, Betriebsbereitschaft des Detektors, des Trennsystems, des Schreibers usw.

5.4.1.2. Wird die Säule zum erstenmal verwendet, ist es ratsam, sie einzufahren. Einen schwachen Gasstrom durch die Säule geben, den Gaschromatographen einschalten und allmählich auf eine Temperatur von mindestens 20 °C über der Arbeitstemperatur (Anmerkung 7) aufheizen. Diese Temperatur mindestens 2 Stunden konstant halten und dann die Analysenbedingungen einstellen (Gasstrom, Split, Zünden der Flamme, Schreibanschluss, Ofentemperatur, Injektor, Detektor). 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 mangelhaftes Einfahren der Säule hin.

Anmerkung 7: 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. Anhaltspunkte für die Arbeitsbedingungen:

- Säulentemperatur: anfangs isotherm 8 Minuten bei 180 °C, dann stufenweise um 5 °C pro Minute bis auf 260 °C ansteigend, anschließend 15 Minuten bei 260 °C,
- Verdampfertemperatur: 280 °C,
- Detektortemperatur: 290 °C
- Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases: 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.,
- Papiervorschub: 30-60 cm/Std.
- Einspritzvolumen: 0,5-1 µl TMSE-Lösung.

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

- Die Retentionszeit des C<sub>26</sub>-Alkohols muss 18 ± 5 Minuten betragen;
- der Peak des C<sub>22</sub>-Alkohols muss bei Olivenöl 80 ± 20 % und bei Samenölen 40 ± 20 % der gesamten Skala erreichen.

5.4.2.2. Zur Überprüfung der vorstehenden Bedingungen werden wiederholt Proben von TMSE-Alkohol-Gemischen eingespritzt und die Arbeitsbedingungen optimiert.

5.4.2.3. Die Parameter für die Peak-Integration sind so zu wählen, dass für die in Betracht kommenden Peaks korrekte Werte erzielt werden.

##### 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.

5.4.3.2. Das Chromatogramm aufzeichnen, bis alle vorhandenen aliphatischen Alkohole eluiert sind. Die Grundlinie muss stets den vorgeschriebenen Anforderungen (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 TSME-Gemisch der aliphatischen Alkohole identifiziert.

Abbildung 1 zeigt ein Chromatogramm der Alkoholfraktion eines nativen Olivenöls.

## 5.4.5. Quantitative Bestimmung

5.4.5.1. Die Peakflächen von 1-Eicosanol und der aliphatischen Alkohole C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub> und C<sub>28</sub> werden mit Hilfe eines Integrators ermittelt.

5.4.5.2. Der Gehalt an den einzelnen aliphatischen Alkoholen in mg/1 000 g Fett wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Alkohol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

Hierin bedeuten:

A<sub>x</sub> = Peakfläche des Alkohols x,

A<sub>s</sub> = Peakfläche von 1-Eicosanol,

m<sub>s</sub> = zugesetzte Menge 1-Eicosanol in mg,

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

## 6. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

Der Gehalt an den einzelnen aliphatischen Alkoholen wird in mg/1 000 g Fett angegeben und zum ‚Gesamtgehalt an aliphatischen Alkoholen‘ addiert.

## ANLAGE

*Bestimmung der linearen Strömungsgeschwindigkeit*

In den auf Normalbedingungen eingestellten Gaschromatographen werden 1 bis 3 µl Methan (oder Propan) eingespritzt und die von dem Gas benötigte Durchlaufzeit durch die Säule vom Zeitpunkt des Einspritzens bis zum Peak-Austritt ( $t_M$ ) 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  $t_M$  die gemessene Zeit in Sekunden.

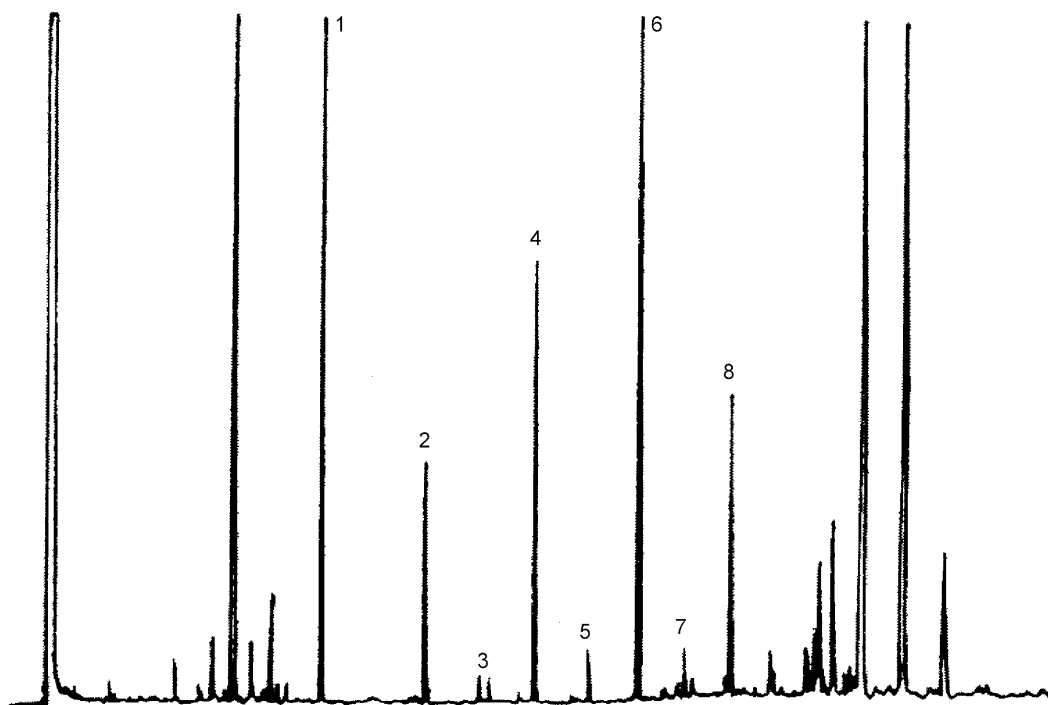


Abbildung 1 — Chromatogramm der Alkoholfraktion eines nativen Olivenöls

1 = Eicosanol	5 = Pentacosanol
2 = Docosanol	6 = Hexacosanol
3 = Tricosanol	7 = Heptacosanol
4 = Tetracosanol	8 = Octacosanol