

Denne tekst tjener udelukkende som dokumentationsværktøj og har ingen retsvirkning. EU's institutioner påtager sig intet ansvar for dens indhold. De autentiske udgaver af de relevante retsakter, inklusive deres betragtninger, er offentliggjort i den Europæiske Unions Tidende og kan findes i EUR-Lex. Disse officielle tekster er tilgængelige direkte via linkene i dette dokument

► B **KOMMISSIONENS FORORDNING (EØF) Nr. 2568/91**
af 11. juli 1991
om kendetegnene for olivenolie og olie af olivenpresserester og de i den forbindelse anvendte metoder
(EFT L 248 af 5.9.1991, s. 1)

Ændret ved:

		Tidende		
		nr.	side	dato
► <u>M1</u>	Kommissionens forordning (EØF) nr. 3682/91 af 17. december 1991	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u>	Kommissionens forordning (EØF) nr. 1429/92 af 26. maj 1992	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u>	Kommissionens forordning (EØF) nr. 1683/92 af 29. juni 1992	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u>	Kommissionens forordning (EØF) nr. 1996/92 af 15. juli 1992	L 199	18	18.7.1992
► <u>M5</u>	Kommissionens forordning (EØF) nr. 3288/92 af 12. november 1992	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u>	Kommissionens forordning (EØF) nr. 183/93 af 29. januar 1993	L 22	58	30.1.1993
► <u>M7</u>	ændret ved Kommissionens forordning (EØF) nr. 826/93 af 6. april 1993	L 87	6	7.4.1993
► <u>M8</u>	Kommissionens forordning (EØF) nr. 620/93 af 17. marts 1993	L 66	29	18.3.1993
► <u>M9</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 177/94 af 28. januar 1994	L 24	33	29.1.1994
► <u>M10</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 2632/94 af 28. oktober 1994	L 280	43	29.10.1994
► <u>M11</u>	kommissionens forordning (EF) nr. 656/95 af 28. marts 1995	L 69	1	29.3.1995
► <u>M12</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 2527/95 af 27. oktober 1995	L 258	49	28.10.1995
► <u>M13</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 2472/97 af 11. december 1997	L 341	25	12.12.1997
► <u>M14</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 282/98 af 3. februar 1998	L 28	5	4.2.1998
► <u>M15</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 2248/98 af 19. oktober 1998	L 282	55	20.10.1998
► <u>M16</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 379/1999 af 19. februar 1999	L 46	15	20.2.1999
► <u>M17</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 455/2001 af 6. marts 2001	L 65	9	7.3.2001
► <u>M18</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 2042/2001 af 18. oktober 2001	L 276	8	19.10.2001
► <u>M19</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 796/2002 af 6. maj 2002	L 128	8	15.5.2002
► <u>M20</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 1989/2003 af 6. november 2003	L 295	57	13.11.2003
► <u>M21</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 702/2007 af 21. juni 2007	L 161	11	22.6.2007
► <u>M22</u>	Kommissionens forordning (EF) nr. 640/2008 af 4. juli 2008	L 178	11	5.7.2008
► <u>M23</u>	Kommissionens forordning (EU) nr. 61/2011 af 24. januar 2011	L 23	1	27.1.2011
► <u>M24</u>	Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) nr. 661/2012 af 19. juli 2012	L 192	3	20.7.2012

► <u>M25</u>	Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) nr. 299/2013 af 26. marts 2013	L 90	52	28.3.2013
► <u>M26</u>	Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) nr. 1348/2013 af 16. december 2013	L 338	31	17.12.2013
► <u>M27</u>	Kommissionens delegerede forordning (EU) 2015/1830 af 8. juli 2015	L 266	9	13.10.2015
► <u>M28</u>	Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) 2015/1833 af 12. oktober 2015	L 266	29	13.10.2015
► <u>M29</u>	Kommissionens gennemførelsesforordning (EU) 2016/1227 af 27. juli 2016	L 202	7	28.7.2016

Berigtiget ved:

- **C1** Berigtigelse, EFT L 176 af 20.7.1993, s. 26 (183/93)
- **C2** Berigtigelse, EUT L 78 af 24.3.2011, s. 73 (61/2011)

▼B**KOMMISSIONENS FORORDNING (EØF) Nr. 2568/91****af 11. juli 1991****om kendetegnene for olivenolie og olie af olivenpresserester og de i den forbindelse anvendte metoder****▼M20***Artikel 1*

1. Som jomfruolie efter punkt 1, litra a) og b), i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF betragtes olie, hvis respektive kendetegn er i overensstemmelse med kendetegnene i punkt 1 og 2 i bilag I til nærværende forordning.

2. Som bomolie efter punkt 1, litra c), i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF betragtes olie, hvis kendetegn er i overensstemmelse med kendetegnene i punkt 3 i bilag I til nærværende forordning.

3. Som raffineret olivenolie efter punkt 2 i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF betragtes olie, hvis kendetegn er i overensstemmelse med kendetegnene i punkt 4 i bilag I til nærværende forordning.

4. Som olivenolie bestående af raffineret olivenolie og jomfruolier efter punkt 3 i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF betragtes olie, hvis kendetegn er i overensstemmelse med kendetegnene i punkt 5 i bilag I til nærværende forordning.

5. Som rå olie af olivenpresserester efter punkt 4 i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF betragtes olie, hvis kendetegn er i overensstemmelse med kendetegnene i punkt 6 i bilag I til nærværende forordning.

6. Som raffineret olie af olivenpresserester efter punkt 5 i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF betragtes olie, hvis kendetegn er i overensstemmelse med kendetegnene i punkt 7 i bilag I til nærværende forordning.

7. Som olie af olivenpresserester efter punkt 6 i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF betragtes olie, hvis kendetegn er i overensstemmelse med kendetegnene i punkt 8 i bilag I til nærværende forordning.

▼ M26*Artikel 2*

1. Bestemmelsen af kendetegnene for de i bilag I fastsatte olier sker ved hjælp af følgende analysemetoder:

- a) til bestemmelse af indholdet af frie fedtsyrer, beregnet som oliesyre, metoden i bilag II
- b) til bestemmelse af peroxidallet, metoden i bilag III
- c) til bestemmelse af voksindhold, metoden i bilag IV
- d) til bestemmelse af sammensætningen og indholdet af steroler og triterpenalkoholer ved gaskromatografi på kapillarsøjle, metoden i bilag V
- e) til bestemmelse af det procentvise indhold af 2-glycerylmonopalmitat, metoden i bilag VII
- f) til den spektrofotometriske undersøgelse, metoden i bilag IX

▼ M28

- g) til bestemmelse af fedtsyrenes sammensætning, metoden i bilag X

▼ M26

- h) til bestemmelse af indholdet af flygtige halogenerede opløsningsmidler, metoden i bilag XI
- til bedømmelse af jomfruolies organoleptiske kendetegn, metoden i bilag XII
- j) til bestemmelse af indholdet af stigmastadiener, metoden i bilag XVII
- k) til bestemmelse af indholdet af ECN42-holdige triglycerider, metoden i bilag XVIII

▼ M28

- l) til bestemmelse af indholdet af alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer, metoden i bilag XIX

▼ M26

- m) til bestemmelse af indholdet af voks, fedtsyremethylestere og fedtsyrethylestere, metoden i bilag XX.

▼ M28

▼ M26

- 2. Den kontrol, som de nationale myndigheder eller deres repræsentanter foretager af de organoleptiske kendetegn for jomfruolie, gennemføres af paneler af smagere, som medlemsstaterne har godkendt.

▼ M26

De organoleptiske kendetegn for en i første afsnit omhandlet olivenolie anses for at stemme overens med den anmeldte type olivenolie, hvis et af den pågældende medlemsstat godkendt panel bekræfter klassifikationen i den henseende.

Hvis panelet ikke bekræfter den anmeldte kategori med hensyn til de organoleptiske kendetegn, lader de nationale myndigheder eller deres repræsentanter på den berørte parts anmodning straks foretage to kontrolanalyser, som udføres af andre godkendte paneler, og hvoraf mindst den ene udføres af et panel, der er godkendt af den pågældende producentmedlemsstat. De pågældende kendetegn anses for at stemme overens med dem, der er anmeldt, hvis de to kontrolanalyser bekræfter den anmeldte klassifikation. I modsat fald pålægges kontrolanalyseudgifterne den berørte part, uden at dette foregriber anvendelsen af sanktioner.

3. Hvad angår de nationale myndigheders eller deres repræsentanters kontrol af oliens kendetegn som omhandlet i stk. 1 udtages der prøver efter de internationale standarder EN ISO 661 og EN ISO 5555 for forberedelse af prøver til forsøg og prøveudtagning. Uanset punkt 6.8 i standard EN ISO 5555 udtages prøverne i henhold til bilag Ia til denne forordning for partier af den nævnte olie i umiddelbare emballager. I tilfælde af bulkolier, hvor prøveudtagningen ikke kan foretages i henhold til EN ISO 5555, gennemføres prøveudtagningen i overensstemmelse med de retningslinjer, der udstedes af medlemsstatens kompetente myndighed.

Med forbehold af bestemmelserne i standard EN ISO 5555 og kapitel 6 i standard EN ISO 661 beskyttes de udtagne prøver straks mod lys og stræk varme og sendes til laboratoriet til analyse senest den femte arbejdsdag efter udtagningsdage, i modsat fald skal prøverne opbevares på en sådan måde, at de ikke bliver ødelagt eller beskadiget under transporten eller opbevaringen, før de sendes til laboratoriet.

4. Med hensyn til kontrollen i stk. 3 foretages analyserne i bilag II, III, IX, XII og XX samt eventuelle kontrolanalyser, der er fastsat ved national lov, inden datoen for mindste holdbarhed, når der er tale om emballerede produkter. Ved prøveudtagning af bulkolier foretages analyserne senest den sjette måned efter den måned, hvor prøven er udtaget.

Der gælder ingen frister for de øvrige analyser, som er fastsat ved nærværende forordning.

Svarer analyseresultaterne ikke til kendetegnene for den anmeldte kategori olivenolie eller olie af olivenpresserester, underrettes den pågældende herom senest en måned inden udløbet af fristen i første afsnit, undtagen hvis prøveudtagningen fandt sted mindre end to måneder inden datoen for mindste holdbarhed.

▼ M26

5. Til bestemmelse af olivenoliernes kendetegn efter metoderne omhandlet i stk. 1, første afsnit, sammenlignes analyseresultaterne direkte med de i denne forordning fastsatte grænseværdier.

▼ M25*Artikel 2a*

1. I denne artikel forstås ved »afsat olivenolie« den samlede mængde af en medlemsstats olivenolie og olie af olivenpresserester, der forbruges i medlemsstaten eller eksporteres fra medlemsstaten.

2. Medlemsstaterne sørger for, at der med passende hyppighed udføres overensstemmelseskontrol, der er selektiv, dvs. bygger på en risikoanalyse, for dermed at sikre, at den afsatte olivenolie svarer til den anmeldte kategori.

3. Kriterierne for vurderingen af risikoen kan omfatte:

a) oliens kategori, produktionstidsrummet, prisen på olien i forhold til andre vegetabiliske olier, blandings- og emballeringsaktiviteter, lageranlæg og opbevaringsforhold, oprindelsesland, bestemmelsesland, transportmåde samt partiets størrelse

b) hvilket led i afsætningskæden de erhvervsdrivende tilhører, hvilke olie kategorier de afsætter og hvor meget, målt i mængde og/eller værdi, samt hvilken virksomhed de udøver, fx presning, lagring, raffinering, blanding, emballering eller detailsalg

c) oplysninger om forhold, der er konstateret under tidligere kontroller, herunder antal og type af konstaterede mangler, den afsatte olies normale kvalitet og det anvendte tekniske udstyrs ydeevne

d) hvor pålidelige de erhvervsdrivendes kvalitetssikringssystemer eller egenkontrollsystemer til kontrol af, om handelsnormerne overholdes, er

e) det sted, hvor kontrollen finder sted, især hvis det er det sted, hvor varen først føres ind i EU eller sidst føres ud af EU, eller det sted, hvor olien produceres, emballeres, læsses eller sælges til den endelige forbruger

f) øvrige oplysninger, der kan tyde på manglende overensstemmelse.

4. Medlemsstaterne fastlægger på forhånd:

a) kriterierne for vurdering af risikoen for, at partier ikke er i overensstemmelse med normerne

b) minimumsantallet af erhvervsdrivende eller partier og/eller mængder, der underkastes overensstemmelseskontrol, på grundlag af en risikoanalyse for hver risikokategori.

▼ M25

Der udføres mindst én overensstemmelseskontrol pr. 1 000 ton olivenolie, der afsættes i medlemsstaten pr. år.

5. Medlemsstaterne kontrollerer overensstemmelsen ved
 - a) at analyserne i bilag I udføres i vilkårlig rækkefølge, eller
 - b) at analyserne udføres i den rækkefølge, der er angivet i beslutningsskemaet i bilag Ib, indtil en af beslutningerne i skemaet træffes.

▼ M19**▼ M25***Artikel 3*

Konstateres det, at en olie ikke svarer til beskrivelsen af dens kategori, anvender medlemsstaten sanktioner, der er effektive, står i rimeligt forhold til overtrædelsen og har afskrækkende virkning, og hvis størrelse afhænger af den konstaterede uregelmæssigheds omfang, uden at dette i øvrigt udelukker eventuelle andre sanktioner.

Hvis der ved kontrollen afsløres væsentlige uregelmæssigheder, øger medlemsstaterne kontrolfrekvensen ud fra sådanne kriterier som afsætningsled, oliekategori, oprindelse mv.

▼ M5*Artikel 4***▼ M19**

1. Med henblik på de nationale myndigheders eller deres repræsentants vurdering og kontrol af de organoleptiske kendetegn kan medlemsstaterne godkende paneler af smagere.

Godkendelsesbetingelserne fastlægges af medlemsstaterne, således at bl.a.

- betingelserne i bilag XII, punkt 4, opfyldes
- det sikres, at panelets leder optrænes af en virksomhed og på betingelser, som er anerkendt af medlemsstaten i den henseende
- godkendelsens gyldighed gøres afhængig af de resultater, der opnås ved en årlig kontrolordning, som medlemsstaten har oprettet.

Hver medlemsstat meddeler Kommissionen listen over godkendte paneler og de foranstaltninger, der er truffet i henhold til dette stykke.

▼ M5

2. Hvis en medlemsstat har vanskeligheder med at oprette et panel på sit område, kan den gøre brug af et godkendt panel i en anden medlemsstat.
3. Hver medlemsstat opstiller en liste over de paneler af smagsdommere, der er oprettet af erhvervs- eller brancheorganisationer på de i stk. 1 fastsatte betingelser, og de kontrollerer, at disse betingelser overholdes.

▼ M19**▼ B***Artikel 6*

1. Olieindholdet i presserester og andre restprodukter fra udvinding af olivenolie (KN-kode 2306 90 11 og 2306 90 19) bestemmes efter metoden i bilag XV.

▼B

2. Det i stk. 1 omhandlede olieindhold udtrykkes i vægtprocent af tørstoffet.

▼M20*Artikel 7*

EF-bestemmelserne om forekomst af forurenende stoffer finder anvendelse.

Hvad indholdet af halogenerede opløsningsmidler angår, gælder følgende grænseværdier for alle kategorier af olivenolie:

- Maksimalt indhold af hvert påvist halogeneret opløsningsmiddel: 0,1 mg/kg
- Maksimalt samlet indhold af påviste halogenerede opløsningsmidler: 0,2 mg/kg.

▼M25*Artikel 7a*

Fysiske eller juridiske personer eller sammenslutninger af sådanne personer, som ligger inde med olivenolie og olie af olivenpresserester, lige fra den udvindes på oliefabrikken, til den er tappet på flasker, uanset til hvilke erhvervsmæssige eller kommercielle formål, skal føre ind- og udgangsbøger for hver kategori af sådanne olier.

Medlemsstaterne sikrer, at forpligtelserne i stk. 1 opfyldes.

Artikel 8

1. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen, hvilke foranstaltninger de træffer til anvendelse af denne forordning. De underretter Kommissionen om eventuelle senere ændringer heraf.

2. Medlemsstaterne sender hvert år senest den 31. maj Kommissionen en rapport om anvendelsen af denne forordning i det foregående kalenderår. Rapporten skal mindst indeholde resultaterne af de overensstemmelseskontroller, der er udført på olivenolie ifølge skemaerne i bilag XXI.

3. De meddelelser, der er nævnt i denne forordning, sendes i overensstemmelse med Kommissionens forordning (EF) nr. 792/2009 ⁽¹⁾

▼B*Artikel 9*

Forordning (EØF) nr. 1058/77 ophæves.

Artikel 10

1. Denne forordning træder i kraft på tredjedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende*.

Metoden i bilag XII anvendes dog fra den ►**M1** 1. november 1992 ◀, undtagen i forbindelse med interventionsforanstaltninger.

⁽¹⁾ EUT L 228 af 1.9.2009, s. 3.

▼ **M5**

Metoden anvendes ikke for jomfruolie, der er aftappet før den 1. november 1992.

▼ **B**

2. Denne forordning anvendes ikke for olivenolie og olie af olivenpresserester, der aftappes inden datoen for denne forordnings ikrafttræden, og som bringes i handelen inden den 31. oktober 1992.

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

▼ B*BILAG***Resumé**

Bilag I:	Kendetegn for olivenolie
Bilag Ia:	Udtagning af prøver af partier af olivenolie eller olie af olivenpresserester leveret i umiddelbare emballager
Bilag Ib:	Bestemmelsskema til kontrol af, om en olivenolieprøve svarer til den anmeldte kategori
Bilag II:	Bestemmelse af indholdet af frie fedtsyrer, kold metode
Bilag III:	Bestemmelse af peroxidallet
Bilag IV:	Bestemmelse af voksindhold ved gaskromatografering med kapillarkolonne
Bilag V:	Bestemmelse af sammensætning og indhold af steroler og triterpenalkoholer ved gaskromatografi på kapillarkolonne
Bilag VII:	► M21 Bestemmelse af indholdet af 2-glycerylmonopalmitat i procent ◀

▼ M20**▼ B**

Bilag IX:	Spektrofotometrisk undersøgelse ved ultraviolet lys
-----------	---

▼ M28

Bilag X:	Bestemmelse af fedtsyremethylestere ved gaskromatografi
----------	---

▼ B

Bilag XI:	Bestemmelse af indholdet af flygtige halogenerede opløsningsmidler i olivenolie
Bilag XII:	Det internationale olivenråds metode til organoleptisk vurdering af jomfruolier

▼ M20**▼ M19****▼ B**

Bilag XV:	Olieindhold i presserester af oliven
Bilag XVI:	Bestemmelse af iodtal
Bilag XVII:	Metode til bestemmelse af stigmastadiener i vegetabiliske olier
Bilag XVIII:	Bestemmelse af forskellen mellem det faktiske og det teoretiske indhold af ECN 42-triacylglyceroler
Bilag XIX:	► M28 Bestemmelse af indholdet af alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer ved gaskromatografi på kapillarkolonne ◀

▼ M23

Bilag XX:	Metode til bestemmelse af indholdet af voks, fedtsyremethylestere og fedtsyrethylestere ved gaskromatografi på kapillarkolonne
-----------	--

▼ M28**▼ M25**

Bilag XXI:	Resultaterne af overensstemmelseskontroller, der er udført på olivenolie, jf. artikel 8, stk. 2
------------	---

BILAG I

KENDETEGN FOR OLIVENOLIE

Kategori	Fedtsyrethylestere (FAEE) mg/kg (*)	Syreindhold (%) (*)	Peroxidtal mEq O ₂ /kg (*)	Voks mg/kg (**)	2-glycerylmonopalmitat (%)	Stigmastadiener mg/kg (1)	Forskel mellem ECN42 (HPLC) og ECN42 (teoretisk beregnet)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ eller K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptisk vurdering Median for mangler (Md) (*)	Organoleptisk vurdering Median for egenskaben frugtagtig (Mf) (*)
1. Ekstra jomfruolie	FAEE ≤ 40 (2013-2014 produktionsår) (2) FAEE ≤ 35 (2014-2016 produktionsår) FAEE ≤ 30 (efter 2016 produktionsår)	≤ 0,8	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9, hvis palmitinsyre i alt ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0, hvis palmitinsyre i alt > 14 %							
2. Jomfruolie	—	≤ 2,0	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9, hvis palmitinsyre i alt ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0, hvis palmitinsyre i alt > 14 %							

▼ M27

Kategori	Fedtsyreethylestere (FAEE) mg/kg (*)	Syreindhold (%) (*)	Peroxidtal mEq O ₂ /kg (*)	Voks mg/kg (**)	2-glycerylmonopalmitat (%)	Stigmastadiener mg/kg (1)	Forskel mellem ECN42 (HPLC) og ECN42 (teoretisk beregnet)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ eller K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptisk vurdering Median for mangler (Md) (*)	Organoleptisk vurdering Median for egenskaben frugtagtig (Mf) (*)
3. Bomolie	—	> 2,0	—	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 300 (3)	≤ 0,9 hvis palmitinsyre i alt ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (4)	—
					≤ 1,1, hvis palmitinsyre i alt > 14 %							
4. Raffineret olivenolie	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 hvis palmitinsyre i alt ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1, hvis palmitinsyre i alt > 14 %							
5. Olivenolie bestående af raffinerede olivenolier og jomfruolier	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 hvis palmitinsyre i alt ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0, hvis palmitinsyre i alt > 14 %							

▼ M27

Kategori	Fedtsyreethylestere (FAEE) mg/kg (*)	Syreindhold (%) (*)	Peroxidital mEq O ₂ /kg (*)	Voks mg/kg (**)	2-glycerilmonopalmitat (%)	Stigmastadiener mg/kg (1)	Forskel mellem ECN42 (HPLC) og ECN42 (teoretisk beregnet)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ eller K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptisk vurdering Median for mangler (Md) (*)	Organoleptisk vurdering Median for egenskaben frugtagtig (Mf) (*)
6. Rå olie af olivenpresserester	—	—	—	C40 + C42 + C44 + C46 > 350 (5)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Raffineret olie af olivenpresserester	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Olie af olivenpresserester	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42+C44+C46 > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Summen af isomerer, der eventuelt kan adskilles på kapillarsøjle.

(2) Denne grænse gælder for olivenolier, der produceres fra den 1. marts 2014.

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

(4) Eller hvis medianen for mangler er lig med eller derunder, og medianen for lugt og smag er 0.

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

▼ M27

Kategori	Fedtsyresammensætning ⁽¹⁾						Summen af isomerer af trans-oliesyre (%)	Summen af trans-linolsyre og isomerer af trans-linolensyre (%)	Sterolsammensætning						Steroler i alt (mg/kg)	Erythrodiol og uvaol (%) (**)
	Myristin (%)	Linolen (%)	Arachin (%)	Eicosan (%)	Behen (%)	Lignocerin (%)			Kolesterol (%)	Brassicasterol (%)	Camposterol ⁽²⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App beta-sitosterol (%) ⁽³⁾ (%) (**)	Delta-7-stigmasterol ⁽²⁾ (%)		
1. Ekstra jomfruolie	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Jomfruolie	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Bomolie	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽⁴⁾
4. Raffineret olivenolie	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Olivenolie bestående af raffinerede olivenolier og jomfruolier	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Rå olie af olivenpresserester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁵⁾
7. Raffineret olie af olivenpresserester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5

▼ M27

Kategori	Fedtsyresammensætning ⁽¹⁾						Summen af isomerer af trans-oliesyre (%)	Summen af trans-linolensyre og isomerer af trans-linolensyre (%)	Sterolsammensætning						Steroler i alt (mg/kg)	Erythrodiol og uvaol (%) (**)
	Myristin (%)	Linolen (%)	Arachin (%)	Eicosan (%)	Behen (%)	Lignocerin (%)			Kolesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol ⁽²⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App beta-sitosterol (%) ⁽³⁾ (%) (**)	Delta-7-stigmastanol ⁽²⁾ (%)		
8. Olie af olivenpresserester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

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

⁽²⁾ Se tillægget til dette bilag.

⁽³⁾ App β-sitosterol: Delta-5,23-stigmastadienol + chlosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadienol.

⁽⁴⁾ Olier med et voksindhold på mellem 300 mg/kg og 350 mg/kg betragtes som bomolie, hvis det samlede indhold af alifatiske alkoholer er på 350 mg/kg eller derunder, eller hvis indholdet af erythrodiol og uvaol er på 3,5 % eller derunder.

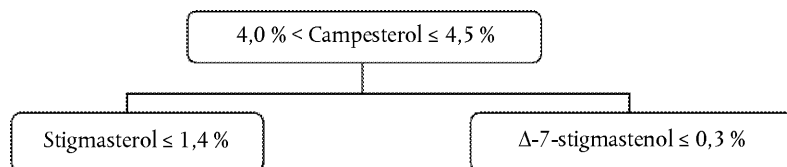
⁽⁵⁾ Olier med et voksindhold på mellem 300 mg/kg og 350 mg/kg betragtes som rå olie af olivenpresserester, hvis det samlede indhold af alifatiske alkoholer er på over 350 mg/kg, og hvis indholdet af erythrodiol og uvaol er på over 3,5 %.

Noter:

- Analyseresultaterne skal anføres med lige så mange decimaler som dem, der er angivet for hvert kendetegn. Sidste ciffer skal forhøjes med en enhed, hvis det følgende ciffer er større end 4.
- Hvis de fastsatte grænseværdier overskrides for blot ét kendetegn, klassificeres olien i en anden kategori eller erklæres for ikke at opfylde renhedskravene i henhold til denne forordning.
- Hvis et kvalitetskendetegn er mærket med en asterisk (*), betyder det følgende: — for bomolie, at de pågældende grænseværdier ikke alle skal være opfyldt samtidig — for jomfruolie, at olien skal klassificeres i en anden kategori, hvis blot én af disse grænseværdier ikke er opfyldt, men at den fortsat skal klassificeres i en af kategorierne for jomfruolie.
- Hvis et kvalitetskendetegn er mærket med to asterisker (**), betyder det for alle de pågældende olier af olivenpresserester, at alle grænseværdier ikke behøver være opfyldt samtidig.

▼ M27

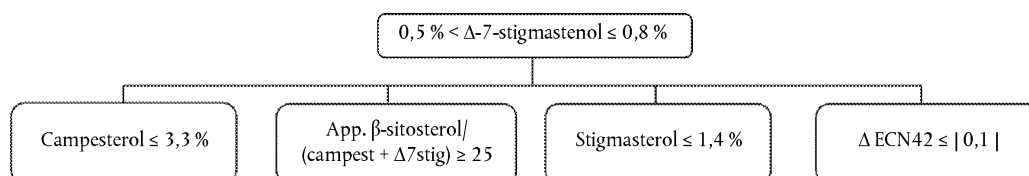
Tillæg

BESLUTNINGSSKEMA**Campesterol**-beslutningsskema for jomfruolie og ekstra jomfruolie:

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

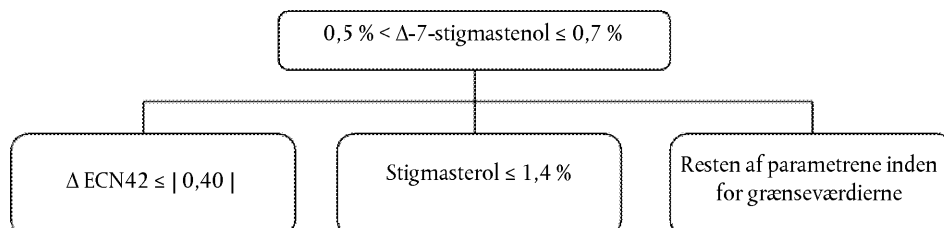
Delta-7-stigmasterol-beslutningsskema for:

— Ekstra jomfruolie og jomfruolie



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

— Olie af olivenpresserester (rå og raffineret)



▼ **M26***BILAG Ia***UDTAGNING AF PRØVER AF PARTIER AF OLIVENOLIE ELLER OLIE AF OLIVENPRESSERESTER LEVERET I UMIDDELBARE EMBALLAGER**

Denne prøveudtagningsmetode anvendes for partier af olivenolie eller olie af olivenpresserester aftappet i umiddelbare emballager. Der anvendes forskellige prøveudtagningsmetoder afhængigt af, om den umiddelbare emballage er større eller mindre end 5 liter.

Ved "parti" forstås de salgsenheder, der produceres, fremstilles og aftappes under sådanne forhold, at olien i alle disse salgsenheder anses for homogen med hensyn til alle analysekendetegn. Et parti skal identificeres i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2011/91/EU ⁽¹⁾.

Ved "delprøve" forstås den mængde olie, der er indeholdt i en umiddelbar emballage, og som udtages et vilkårligt sted i partiet.

1. BASISPRØVENS INDHOLD**1.1. Umiddelbar emballage på højst 5 liter**

Ved "basisprøve" for umiddelbare emballager på højst 5 liter forstås det antal delprøver, der udtages fra et parti og i overensstemmelse med tabel 1.

*Tabel 1***Minimumsstørrelse for basisprøve omfatter følgende**

Hvis de umiddelbare emballager indeholder	tages basisprøven af olien i
a) 1 liter eller derover	a) 1 umiddelbar emballage
b) under 1 liter	b) det mindste antal emballager, hvis samlede indhold overstiger 1,0 liter

Det antal emballager, der er anført i tabel 1, som udgør en basisprøve, kan efter behov forøges af medlemsstaterne (hvis organoleptisk vurdering f.eks. foretages af et andet laboratorium end det, der udførte de kemiske analyser, modanalysen osv.).

1.2. Umiddelbar emballage på mere end 5 liter

Ved "basisprøve" for umiddelbare emballager på mere end 5 liter forstås en repræsentativ del af de samlede delprøver, der fås ved en reduktionsproces og i overensstemmelse med tabel 2. Basisprøven sammensættes af forskellige eksempler.

Ved "eksempel" på en basisprøve forstås hver af de emballager, der udgør basisprøven.

*Tabel 2***Mindste antal delprøver, der skal udtages**

Antal emballager i partiet	Mindste antal delprøver, der skal udtages
Op til 10	1
Fra ... 11 til 150	2

⁽¹⁾ Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2011/91/EU af 13. december 2011 om angivelser af eller mærker til identifikation af et bestemt levnedsmiddelparti (EUT L 334 af 16.12.2011, s. 1).

▼ **M26**

Antal emballager i partiet	Mindste antal delprøver, der skal udtages
Fra ... 151 til 500	3
Fra ... 501 til 1 500	4
Fra ... 1 501 til 2 500	5
> 2 500 pr. 1 000 emballager	1 ekstra delprøve

For at begrænse prøvetagningen i forbindelse med umiddelbare emballager homogeniseres indholdet af delprøver med henblik på fremstilling af basisprøven. Portionerne af de forskellige delprøver hældes i en fælles beholder og homogeniseres ved omrøring, således at basisprøven er bedst muligt beskyttet mod luft.

Indholdet af basisprøven hældes i en serie af emballager, der kan indeholde mindst 1,0 liter, og som hver udgør et eksempel på basisprøven.

Antallet af basisprøver kan efter behov forøges af medlemsstaterne (hvis organoleptisk vurdering f.eks. foretages af et andet laboratorium end det, der udførte de kemiske analyser, modanalysen osv.).

Hver emballage skal fyldes på en sådan måde, at luftlaget øverst er så lille som muligt, og skal derefter lukkes og forsegles effektivt med henblik på at beskytte produktet mod manipulation.

Disse eksempler forsynes med etiket for at sikre korrekt identifikation.

2. ANALYSER OG RESULTATER

- 2.1. Hver basisprøve opdeles i laboratorieprøver, jf. punkt 2.5 i standard EN ISO 5555, og analyseres i overensstemmelse med den rækkefølge, der fremgår af beslutningsskemaet i bilag Ib, eller i en anden vilkårlig rækkefølge.
- 2.2. Hvis alle analyseresultaterne svarer til kendetegnene for den anmeldte oliekategori, anses hele det pågældende parti for at opfylde kravene.

Hvis et analyseresultat ikke svarer til kendetegnene for den anmeldte oliekategori, anses hele det pågældende parti for ikke at opfylde kravene.

3. KONTROL AF PARTIETS KATEGORI

- 3.1. Med henblik på at kontrollere partiets kategori kan den kompetente myndighed forøge det antal basisprøver, der udtages på forskellige steder i partiet, i overensstemmelse med følgende tabel:

Tabel 3

Antal basisprøver fastsat på grundlag af partiets størrelse

Partiets størrelse (liter)	Antal basisprøver
Under 7 500	2
Fra 7 500 til 25 000	3
Fra 25 000 til 75 000	4
Fra 75 000 til 125 000	5
125 000 eller derover	6 + 1 for hver yderligere 50 000 liter

▼M26

Hver delprøve, der udgør en basisprøve, skal udtages fra et kontinuerligt sted i partiet. Placeringen af hver basisprøve skal registreres, og den skal identificeres utvetydigt.

Hver basisprøve fremstilles ved hjælp af procedurerne i punkt 1.1 og 1.2.

Hver basisprøve analyseres derefter som beskrevet i artikel 2, stk. 1.

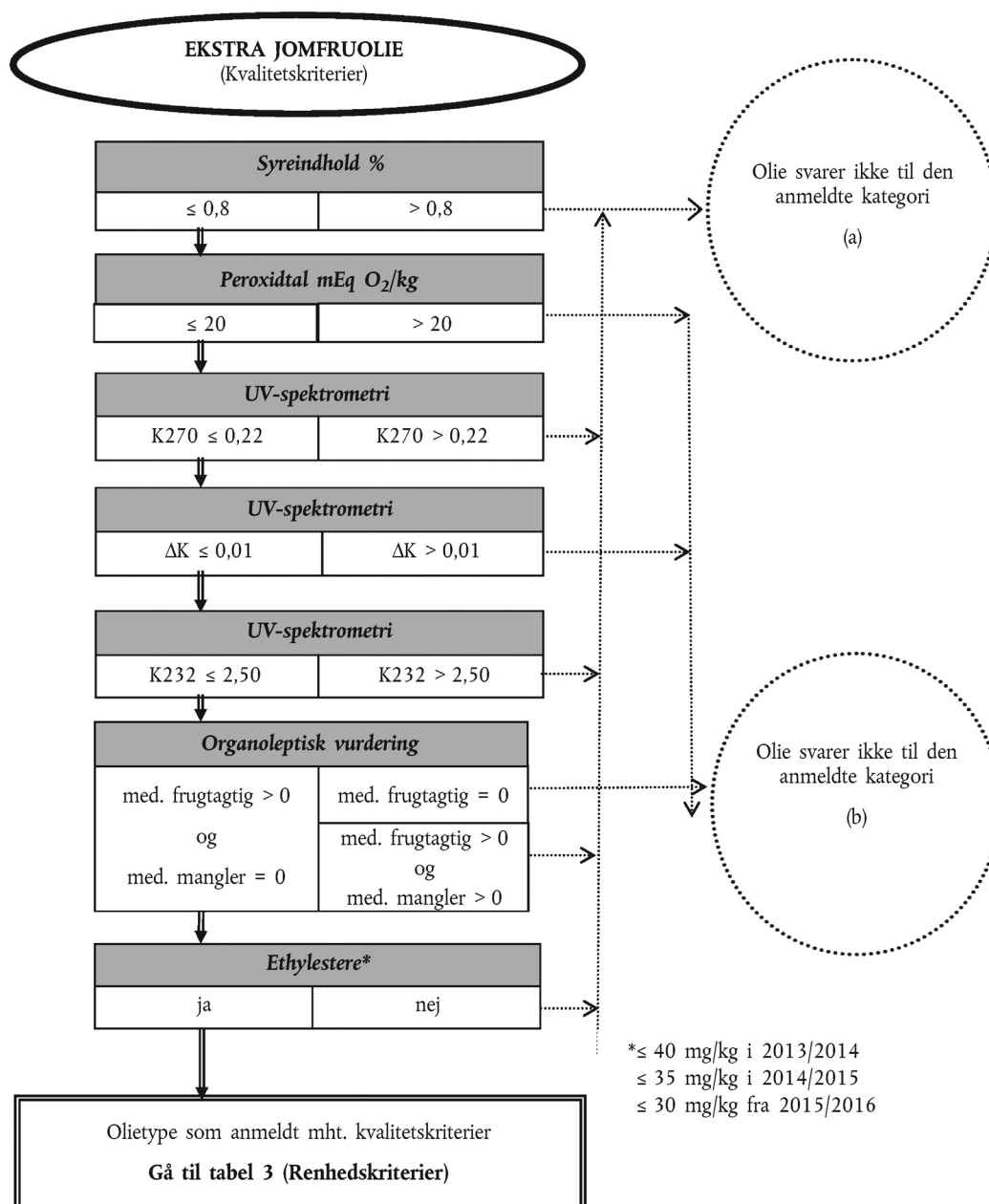
- 3.2. Hvis et af resultaterne af de analyser, der er beskrevet i artikel 2, stk. 1, af mindst én basisprøve ikke svarer til kendetegnene for den anmeldte oliekategori, anses hele det pågældende parti for ikke at opfylde kravene.

▼ **M26**

BILAG Ib

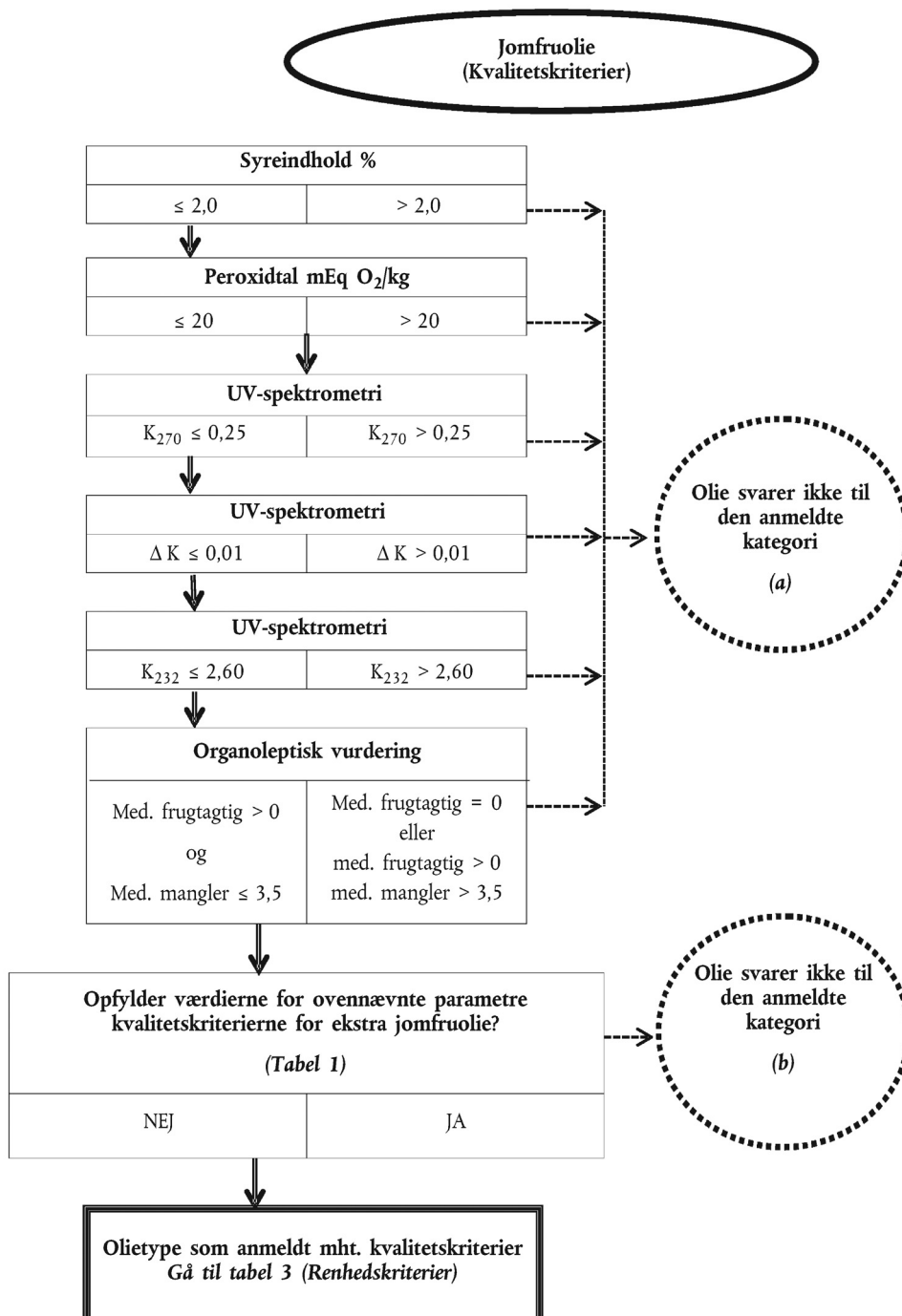
BESLUTNINGSSKEMA TIL KONTROL AF, OM EN OLIVENOLIEPRØVE SVARER TIL DEN ANMELDTE KATEGORI

Tabel 1



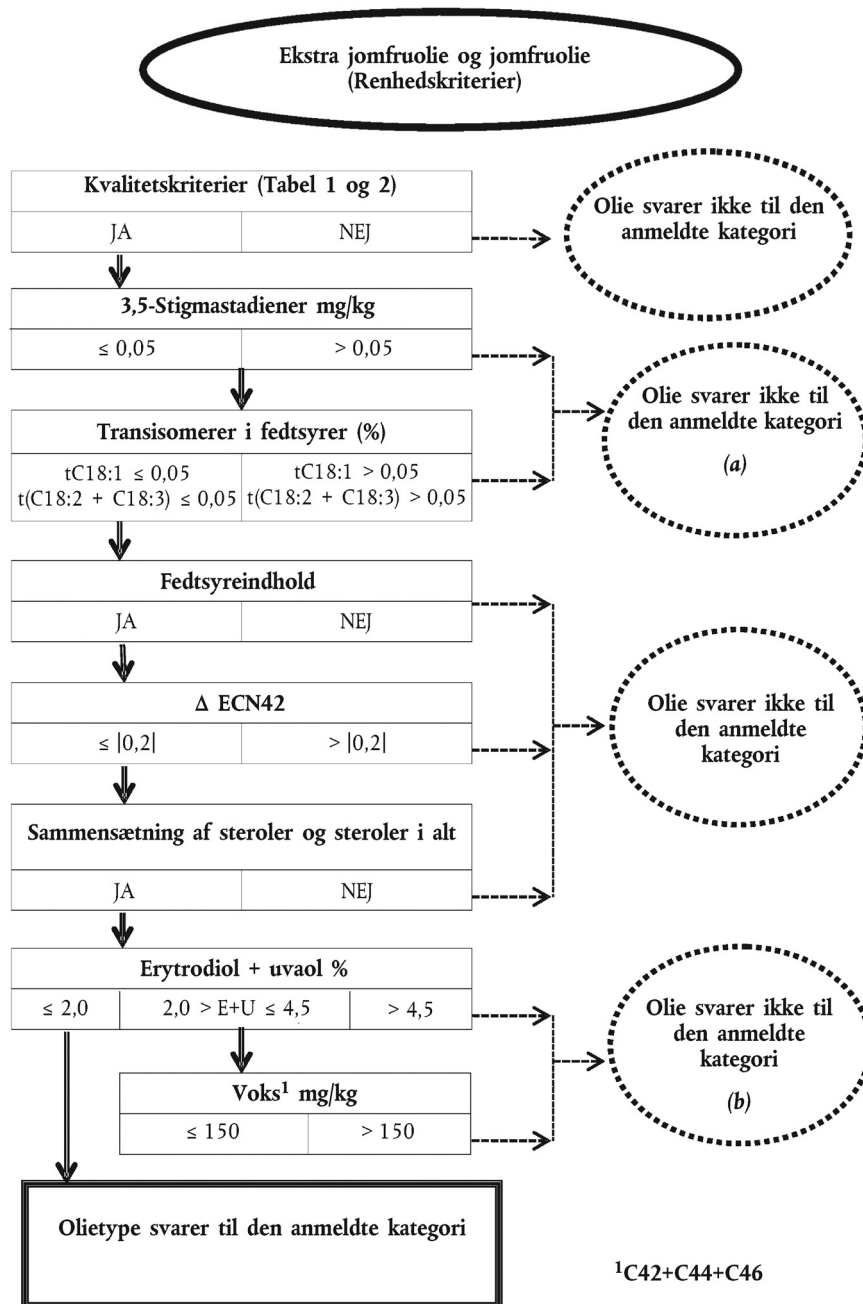
▼ M26

Tabel 2



▼ M26

Tabel 3



▼ **M26***Tillæg 1***Overensstemmelse mellem bilagene til denne forordning og de i beslutningsskemaet nævnte analyser**

— Syreindhold	Bilag II	Bestemmelse af indholdet af frie fedtsyrer, kold metode
— Peroxidtal	Bilag III	Bestemmelse af peroxidtal
— UV-spektrometri	Bilag IX	Spektrofotometrisk analyse
— Organoleptisk vurdering	Bilag XII	Organoleptisk vurdering af jomfruolie
— Ethylestere	Bilag XX	Metode til bestemmelse af indholdet af voks, fedtsyremethylestere og fedtsyreethylestere ved gaskromatografi på kapillarkolonne
— Stigmasta-3,5-dien	Bilag XVII	Metode til bestemmelse af stigmastadiener i vegetabiliske olier
▼ M28		
— Transisomerer i fedtsyrer	Bilag X	Bestemmelse af fedtsyremethylestere ved gaskromatografi
— Fedtsyreindhold	Bilag X	Bestemmelse af fedtsyremethylestere ved gaskromatografi
▼ M26		
— ΔECN42	Bilag XVIII	Bestemmelse af sammensætning af triglycerider i ECN42 (forskel mellem HPLC-data og teoretisk indhold)
— Sammensætning af steroler og steroler i alt	Bilag V	Bestemmelse af sammensætning og indhold af steroler og triterpenalkoholer ved gaskromatografi på kapillarkolonne
— Erytrodiol og uvaol		
— Voks	Bilag IV	Bestemmelse af voksindhold ved gaskromatografering med kapillarkolonne
▼ M28		
— Alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer	Bilag XIX	Bestemmelse af indholdet af alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer ved gaskromatografi på kapillarkolonne
▼ M26		
— Mættede fedtsyrer i 2-stillingen	Bilag VII	Bestemmelse af indholdet af 2-glycerylmonopalmitat i procent

▼ **M29***BILAG II***BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF FRIE FEDTSYRER, KOLD METODE**

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden er en procedure til bestemmelse af indholdet af frie fedtsyrer i olivenolier og olier af olivenpresserester. Indholdet af frie fedtsyrer udtrykkes ved syreindhold beregnet som procentdelen af oliesyre.

2. PRINCIP

En analyseprøve opløses i en blanding af opløsningsmidler, hvorefter de tilstedeværende frie fedtsyrer bestemmes ved hjælp af en opløsning af kaliumhydroxid eller natriumhydroxid.

3. REAGENSER

Samtlige reagenser skal være af anerkendt analysekvalitet, og der anvendes destilleret vand eller vand af tilsvarende renhed.

3.1. Diethylether/ethanol, 95 % (v/v), blandet i forholdet 1:1 efter rumfang.

Nøjagtigt på anvendelsestidspunktet neutraliseres med en opløsning af kaliumhydroxid (3.2) ved tilstedeværelse af 0,3 ml phenolphthaleinopløsning (3.3) pr. 100 ml blanding.

Note 1: Diethylether er meget let antændelig og kan danne eksplosive peroxider. Under anvendelsen skal der derfor træffes særlige forholdsregler.

Note 2: Hvis det ikke er muligt at anvende diethylether, kan en blanding af opløsningsmidler bestående af ethanol og toluen anvendes. Om nødvendigt kan ethanolen erstattes af 2-propanol.

3.2. Indstillet opløsning af kaliumhydroxid eller natriumhydroxid i ethanol eller vand, $c(\text{KOH})$ ca. 0,1 mol/l eller om nødvendigt $c(\text{KOH})$ [eller $c(\text{NaOH})$] ca. 0,5 mol/l. Disse opløsninger kan købes i handelen.

Den nøjagtige koncentration af kaliumhydroxidopløsningen (eller natriumhydroxidopløsningen) i ethanol eller vand skal være kendt og kontrolleres før brug. Der anvendes en opløsning, der er fremstillet mindst fem dage før brugen og dekanteret over i en flaske af brunt glas, lukket med en gummiprop. Opløsningen skal være farveløs eller strågul.

Hvis der observeres faseadskillelse ved anvendelse af kaliumhydroxidopløsningen (eller natriumhydroxidopløsningen) i vand, erstattes den vandige opløsning af en ethanolopløsning.

Note 3: En stabil farveløs opløsning af kaliumhydroxid (eller natriumhydroxid) kan fremstilles på følgende måde: 1 000 ml ethanol med 8 g kaliumhydroxid (eller natriumhydroxid) og 0,5 g aluminiumspåner bringes i kog og holdes kogende i 1 time med tilbageløb. Derefter destilleres omgående, og den krævede mængde kaliumhydroxid (eller natriumhydroxid) opløses i destillatet. Man lader opløsningen henstå i flere dage og dekanterer derefter den øverste klare væske fra bundfaldet af kaliumcarbonat (natriumcarbonat).

Opløsningen kan også fremstilles uden destillation på følgende måde: til 1 000 ml ethanol (eller vand) tilsættes 4 ml aluminiumbutylat, hvorefter man lader blandingen henstå i nogle dage. Derefter dekanteres den ovenstående væske fra, og heri opløses den krævede mængde kaliumhydroxid (natriumcarbonat) opløses heri. Denne opløsning er klar til brug.

▼ M29

3.3. Phenolphthaleinopløsning, 10 g/l i 95-96 % (v/v) ethanol, eller alkaliblåt 6B eller thymolphthaleinopløsning, 20 g/l i 95-96 % (v/v) ethanol. Ved stærkt farvede olier skal alkaliblåt eller thymolphthalein anvendes.

4. APPARATUR

Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder:

4.1 Analysevægt.

4.2 250 ml Erlenmeyer-kolbe.

4.3 10 ml burette, klasse A, med 0,05 ml inddelinger, eller tilsvarende automatburette.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. **Forberedelse af analyseprøve**

Hvis analyseprøven er uklar, skal den filtreres.

5.2. **Analyseprøve**

Ud fra det antagne syreindhold udtages en prøve efter angivelserne i følgende tabel:

Forventet syreindhold (oliesyreindhold g/100g)	Prøvens masse (g)	Prøven afvejes med en nøjagtighed i g på
0-2	10	0,02
> 2-7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Prøven afvejes i Erlenmeyer-kolben (4.2).

5.3. **Bestemmelse**

Prøven (5.2) opløses i 50-100 ml af den på forhånd neutraliserede blanding af diethylether/ethanol (3.1).

Under omrøring titreres med kaliumhydroxidopløsning (eller natriumhydroxidopløsning), 0,1 mol/l (3.2) (se note 4), indtil indikatoren slår om (farveindikatorens farve skal holde sig i mindst 10 sek.).

Note 4: Hvis den nødvendige mængde 0,1 mol/l kaliumhydroxidopløsning (eller natriumhydroxidopløsning) overstiger 10 ml, anvendes i stedet en opløsning på 0,5 mol/l, eller prøvens masse tilpasses til det forventede indhold af frie syrer og den foreslåede tabel.

Note 5: Bliver opløsningen uklar under titreringen, tilsættes så meget opløsningsmiddelblanding (3.1), at opløsningen bliver klar.

Der udføres endnu en bestemmelse, hvis det første resultat ligger over den fastlagte grænseværdi for den pågældende oliekategori.

▼ M29

6. ANGIVELSE AF RESULTATER

Syreindholdet i % oliesyre, udtrykt som vægtprocent =

$$V \times c \times \frac{M}{1\,000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

hvor:

V = rumfanget i ml af den anvendte titrerede kaliumhydroxidopløsning (eller natriumhydroxidopløsning)

c = den nøjagtige koncentration i mol/l af den anvendte titrerede kaliumhydroxidopløsning (eller natriumhydroxidopløsning)

M = 282 g/mol, molvægten i g/mol af oliesyren

m = massen af analyseprøven i gram.

Oliesyreindhold angives som følger:

a) to decimaler for værdier fra 0 og til og med 1

b) én decimal for værdier fra 1 og til og med 100.

▼B*BILAG III***BESTEMMELSE AF PEROXIDTALLET**

1. OMRÅDE

Denne standard beskriver en metode til bestemmelse af peroxidallet for olier og fedtstoffer.

2. ANVENDELSESOMRÅDE

Denne standard finder anvendelse for animalske og vegetabiliske olier og fedtstoffer.

3. DEFINITION

Peroxidallet angiver den mængde stoffer i prøven, udtrykt som milliækvivalenter aktivt oxygen pr. kg, som oxiderer kaliumiodid under de beskrevne forsøgsbetingelser.

4. PRINCIP

Analyseprøven, opløst i en blanding af eddikesyre og chloroform, behandles med en opløsning af kaliumiodid. Det frigjorte iod titreres med en indstillet natriumthiosulfatopløsning.

5. APPARATUR

Alt udstyr skal være fri for reducerende og oxiderende stoffer.

Note: Sliboverflader må ikke indfedtes.

5.1. 3 ml glasske.

5.2. Kolber med slib og prop, på ca. 250 ml, som på forhånd tørres og fyldes med ren, tør inert gas (nitrogen eller — helst — carbondioxid).

5.3. 25 eller 50 ml burette med 0,1 ml inddeling.

6. REAGENSER

6.1. Analysen chloroform, befriet for oxygen ved gennembobling med ren, tør inert gas.

6.2. Analysen iseddike, befriet for oxygen ved gennembobling med ren, tør inert gas.

6.3. Mættet vandig opløsning af kaliumiodid, fremstillet umiddelbart før brug og fri for iod og iodater.

6.4. Natriumthiosulfat, 0,01 eller 0,002 N nøjagtigt indstillet vandig opløsning, indstillet umiddelbart før brug.

6.5. Stivelsesopløsning, 10 g/l vandig opslæmning, fremstillet umiddelbart før brug ud fra naturlig opløselig stivelse.

7. PRØVE

Prøven udtages og opbevares beskyttet mod lys, holdes nedkølet og opbevares i fuldstændigt fyldte glasbeholdere, der er hermetisk tillukket med slibpropper af glas eller korkpropper.

▼B

8. FREMGANGSMÅDE

Analysen udføres i diffust dagslys eller i kunstigt lys. I en glasske (5.1) eller i mangel heraf en kolbe (5.2) afvejes med en nøjagtighed på 0,001 g en prøvemængde i overensstemmelse med følgende tabel, svarende til det forventede peroxidtal:

Forventet peroxidtal (meq O ₂ /kg)	Analyseprøvens vægt (i g)
0 — 12	5,0 — 2,0
12 — 20	2,0 — 1,2
20 — 30	1,2 — 0,8
30 — 50	0,8 — 0,5
50 — 90	0,5 — 0,3

Proppen tages af en kolbe (5.2), og analyseprøven i glasskeen overføres til kolben. Der tilsættes 10 ml chloroform (6.1), og analyseprøven opløses hurtigt ved omrystning. Derefter tilsættes 15 ml eddikesyre (6.2), efterfulgt af 1 ml kaliumiodidopløsning (6.3). Så sættes proppen hurtigt i, og der omrystes i 1 min., hvorefter man lader kolben henstå i nøjagtigt 5 min. i mørke ved en temperatur på 15 — 25° C.

Der tilsættes ca. 75 ml destilleret vand, og det frigjorte iod titreres med natriumthiosulfatopløsning (6.4) (0,002 N opløsning for forventede værdier under 12, og 0,01 N opløsning for forventede værdier over 12) under kraftig omrystning og med anvendelse af stivelsesopløsning (6.4) som indikator.

Der udføres to bestemmelser på samme analyseprøve.

Samtidig udføres en blindprøve. Hvis resultatet af blindprøven overstiger 0,05 ml 0,01 N natriumthiosulfatopløsning (6.4), udskiftes de urene reagenser.

9. ANGIVELSE AF RESULTATERNE

Peroxidtalet (P.V.), udtrykt i milliækvivalenter aktivt oxygen pr. kg, er givet ved formlen:

$$P.V. = \frac{V \times T \times 1000}{m}$$

hvor:

V = antal ml forbrugt indstillet natriumthiosulfatopløsning (6.4) ved analysen, korrigeret for resultatet af blindprøven

T = den nøjagtige normalitet af den anvendte natriumthiosulfatopløsning (6.4),

m = analyseprøvens vægt i g.

Som resultat angives det aritmetiske gennemsnit af de to udførte bestemmelser.

▼ M21*BILAG IV***BESTEMMELSE AF VOKSINDHOLD VED GASKROMATOGRAFERING MED KAPILLARKOLONNE**

1. GENSTAND

Metoden er en procedure til bestemmelse af voksindholdet i olivenolie. Vokserne adskilles efter antallet af kulstofatomer. Metoden er navnlig velegnet, når der skal skelnes mellem olivenolie, der er udvundet ved presning, og olivenolie, der er udvundet ved ekstraktion (af presserester).

2. PRINCIP

Der tilsættes en egnet intern standard til olien, hvorefter adskillelsen finder sted ved kromatografering på en kolonne med hydratiseret silicagel. Den fraktion, der først elueres under prøvebetingerne (og som har lavere polaritet end triglyceriderne), opsamles og analyseres direkte ved gaskromatografi med kapillarkolonne.

3. APPARATUR

3.1. 25 ml erlenmeyerkolbe

3.2. kromatografikolonne af glas, indvendig diameter 15,0 mm, længde 30-40 cm, med hane

3.3. gaskromatograf til brug med kapillarkolonne og med et system til direkte indsprøjtning i kolonnen, bestående af følgende:

3.3.1. termostatstyret kolonneovn med temperaturprogrammering

3.3.2. kold injektor til direkte indsprøjtning i kolonnen

3.3.3. en flammeioniseringsdetektor og en konverter-forstærker

3.3.4. skriver/integrator, der passer til konverter-forstærkeren (3.3.3), med responstid højst 1 sekund og variabel papirhastighed. (Der kan også benyttes computersystemer, hvor gaskromatografidataene opsamles på en PC.)

3.3.5. kapillarkolonne af glas eller sintret kvarts, længde 8-12 m og indvendig diameter 0,25-0,32 mm, coatet indvendigt med stationær fase i en ensartet lagtykkelse på 0,10-0,30 µm (egnet stationær fase af den kommercielle type SE52 eller SE54)

3.4. mikroinjektionssprøjte på 10 µl med hærdet kanyle til direkte indsprøjtning i kolonnen

3.5. elektrisk vibrator

3.6. rotationsfordamper

3.7. muffelovn

3.8. analysevægt med en nøjagtighed på ± 0,1 mg

3.9. sædvanligt glasudstyr.

4. REAGENSER

4.1. silicagel med kornstørrelse 60-200 µm

Silicagelen anbringes i ovnen ved 500 °C i mindst fire timer. Efter afkøling tilsættes der 2 % vand beregnet på silicagemængden. Pulveret rystes omhyggeligt, til det er ensartet. Opbevares i mørke i mindst tolv timer inden brug.

▼ M21

- 4.2. n-hexan til kromatografi
- 4.3. ethylether til kromatografering
- 4.4. n-heptan til kromatografi
- 4.5. kalibreringsopløsning af 0,1 % (m/v) laurylarachidat i hexan (intern standard) (Der kan også bruges palmitylpalmitat eller myristylstearat.)
 - 4.5.1. Sudan 1 (1-phenylazo-2-naphthol)
- 4.6. bæregas: hydrogen eller helium, ren, til gaskromatografi
- 4.7. hjælpegasser:
 - hydrogen, ren, til gaskromatografi
 - luft, ren, til gaskromatografi.

5. FREMGANGSMÅDE**5.1. Fremstilling af kromatografikolonnen**

15 g silicagel (4.1) opslæmmes i n-hexan (4.2) og hældes i kolonnen (3.2). Når kolonnematerialet har sat sig ved henstand, pakkes det yderligere ved hjælp af en el-vibrator (3.5) for at opnå større homogenitet. Der elueres med 30 ml n-hexan for at fjerne eventuelle urenheder. På vægten (3.8) afvejes der nøjagtig 500 mg af prøven i en 25 ml erlenmeyerkolbe (3.1), og der tilsættes en mængde intern standard (4.5) svarende til det formodede voksindhold. F.eks. tilsættes der 0,1 mg laurylarachidat til presset olivenolie og 0,25-0,5 mg til olie af presserester. Den tilberedte prøve overføres til kromatografikolonnen ved hjælp af to portioner n-hexan (4.2) a 2 ml.

Der aftappes opløsningsmiddel, indtil væskeoverfladen står 1 mm over kolonnematerialet, og ved eluering med yderligere 70 ml n-hexan fjernes det naturlige indhold af n-alkaner. Kromatograferingen startes dernæst ved, at 180 ml af n-hexan/ethylether-blandingen i forholdet 99:1 opsamles med en hastighed på ca. 15 dråber pr. 10 sekunder. Prøveelueringen foretages ved en rumtemperatur på 22 ± 4 °C.

Bemærkninger: — n-hexan/ethylether-blandingen (99:1) skal friskfremstilles hver dag.

- Korrekt eluering af vokserne kan kontrolleres visuelt ved, at der til prøveopløsningen tilsættes 100 µl 1 % Sudan 1 i elueringsvæsken. Farvestoffet har en retentionstid mellem vokser og triglycerider, så når farven har nået bunden af kolonnen, bør elueringen standses, eftersom al voks da er elueret.

Den derved fremkomne fraktion inddampes i en rotationsfordamper (3.6), indtil opløsningsmidlet næsten helt er forsvundet. De sidste 2 ml opløsningsmiddel fjernes ved hjælp af en svag nitrogenstrøm, og derefter tilsættes der 2-4 ml n-heptan.

5.2. Gaskromatografisk analyse**5.2.1. Indledende procedure**

Kolonnen påmonteres gaskromatografen (3.3), idet den ene ende forbindes med injektionssystemet og den anden ende med detektoren. Gaskromatografen kontrolleres (gasledningerne, detektors og skrifters ydeevne, m.v.).

▼ **M21**

Hvis kolonnen ikke har været benyttet før, kan det anbefales at konditionere den. En svag gasstrøm ledes gennem kolonnen, hvorefter gaskromatografen sættes i gang. Der opvarmes gradvis til 350 °C over en periode på ca. fire timer. Denne temperatur holdes i mindst to timer, hvorefter apparaturet indstilles til arbejdsbetingelserne (gasstrømmen indstilles, der tændes for flammen, den elektroniske skriver (3.3.4) tilsættes, kolonneovens og detektorens temperatur indstilles, osv.). Signalet registreres med en følsomhed på mindst det dobbelte af den, der kræves for at foretage analysen. Basislinjen bør være lineær uden nogen form for toppe og uden nogen forstyrrelser.

Negativ drift tyder på utætheder i kolonneforbindelserne, mens positiv drift er tegn på utilstrækkelig konditionering af kolonnen.

5.2.2. *Valg af arbejdsbetingelser*

Arbejdsbetingelserne er normalt som følger:

— kolonnetemperatur:

	20 °C/ minut		5 °C/ minut		20 °C/ minut	
fra 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— detektortemperatur: 350 °C

— indsprøjet mængde: 1 µl af opløsningen i (2-4 ml) n-heptan

— bæregas: helium eller hydrogen med den for den valgte gas optimale lineære hastighed (se tillægget)

— instrumentfølsomhed: skal opfylde nedenstående krav:

Disse betingelser kan ændres alt efter kolonnens og gaskromatografens karakteristika, så man opnår adskillelse af alle vokser, en tilfredsstillende opløsning af toppene (se figuren) og en retentionstid for den interne C₃₂-standard på 18 ± 3 minutter. Voksernes mest repræsentative top skal måle mindst 60 % af fuldt udslag.

Parametrene for toppenes integration fastlægges på en sådan måde, at de relevante toppes arealer vurderes korrekt.

Bemærkning: På grund af den høje sluttemperatur, tillades der en positiv drift på op til 10 % af fuldt udslag.

5.3. **Udførelse af analysen**

Der suges 1 µl af opløsningen op i 10 µl-mikrosprøjten, og stemplet trækkes tilbage, så kanylen er tom. Kanylen stikkes ind i injektionssystemet, og der indsprøjtes hurtigt efter 1-2 sekunder. Efter ca. 5 sekunder trækkes kanylen forsigtigt ud.

Registreringen fortsættes, indtil alle vokserne er helt elueret.

▼M21

Basislinjen skal hele tiden opfylde de fastsatte betingelser.

5.4. **Identifikation af toppene**

Toppene identificeres ud fra retentionstiderne, idet de sammenlignes med blandinger af vokser med kendte retentionstider analyseret under samme betingelser.

Figuren viser et kromatogram af vokser fra jomfruolie.

5.5. **Kvantitativ vurdering**

Arealerne af toppene for den interne standard og de alifatiske C₄₀-C₄₆-estere bestemmes ved hjælp af integratoren.

Indholdet af hver af voksesterne bestemmes i mg pr. kg fedtstof efter formlen:

$$\text{ester, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

hvor:

A_x = arealet af toppen for den enkelte ester i kvadratmillimeter

A_s = arealet af toppen for den interne standard i kvadratmillimeter

m_s = massen af tilsat intern standard i milligram

m = massen af den prøve, der er udtaget til analyse, i gram.

6. **ANGIVELSE AF RESULTATER**

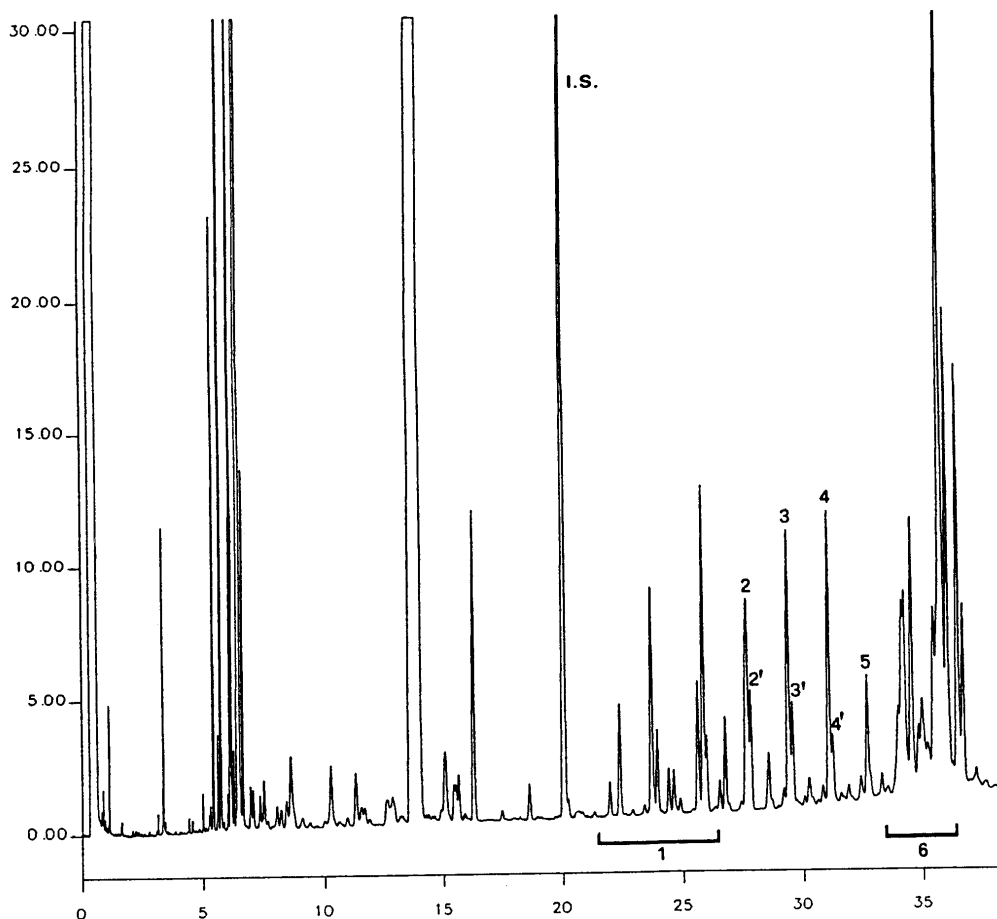
Summen af de forskellige C₄₀-C₄₆-vokser angives i mg pr. kg fedtstof (ppm).

Bemærkning: De bestanddele, der skal bestemmes kvantitativt, er dem med toppe, der kan identificeres som C₄₀-C₄₆-estere med et lige antal kulstofatomer, jf. kromatogrammet af vokser fra jomfruolie i nedenstående figur. Hvis C₄₆-esteren giver en dobbelt top, tilrådes den identificeret ved analyse af voksefraktionen fra olie af olivenpresserester, hvor C₄₆-toppen let kan identificeres på grund af sin størrelse.

Resultaterne angives med en decimal.

▼ M21

Figur

Kromatogram af vokser fra jomfruolie ⁽¹⁾

Signaturer:

I.S. = laurylarachidat

1. = diterpenestere

2 + 2' = C₄₀-estere3 + 3' = C₄₂-estere4 + 4' = C₄₄-estere5 = C₄₆-estere

6 = sterolestere og triterpenalkoholer.

⁽¹⁾ Efter eluering af sterolestrene må kromatogrammet ikke have nogen betydende toppe (triglycerider).

▼ M21*APPENDIKS***Bestemmelse af gassens lineære hastighed**

Der indsprøjtes 1-3 μl methan (eller propan) i gaskromatografen, efter at den er indstillet til normale arbejdsbetingelser. Den tid, som det tager gassen at strømme gennem kolonnen, fra det øjeblik, den indsprøjtes, til toppen viser sig, måles (t_M).

Den lineære hastighed i cm/s beregnes ved formlen L/t_M , hvor L er kolonnens længde i cm og t_M tiden målt i sekunder.

▼ **M26***BILAG V***BESTEMMELSE AF SAMMENSÆTNING OG INDHOLD AF STEROLER OG TRITERPENDINGKOHOLER VED GASKROMATOGRAFI PÅ KAPILLARKOLONNE**

1. OMRÅDE

Denne metode beskriver en fremgangsmåde til bestemmelse af indholdet af de enkelte steroler og det samlede indhold af steroler og triterpentialkoholer i olivenolie og olie af olivenpresserester.
2. PRINCIP

Olie, med α -cholestanol tilsat som en intern standard, forsæbes med kaliumhydroxid i ethanolopløsning, og de bestanddele, der ikke kan forsæbes, ekstraheres derefter med ethylether.

Sterol- og triterpentialkoholfraktionen separeres fra ekstrakten af ikke-forsæbelige stoffer ved tyndtlagskromatografi på en basisk kiselgelplade. De fraktioner, der er indvundet fra kiselgelen, omdannes til trimethylsilylethere og analyseres derefter ved gaskromatografi på kapillarkolonne.
3. APPARATUR

Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder især følgende:

 - 3.1. 250 ml-kolbe monteret med en refluxvaler med samlinger med glasslib.
 - 3.2. 500 ml-skilletteragt.
 - 3.3. 250 ml-kolber.
 - 3.4. Komplet apparatur til analyse ved tyndtlagskromatografi med glasplader, der måler 20 × 20 cm.
 - 3.5. Ultraviolet lampe med en bølgelængde på 254 eller 366 nm.
 - 3.6. 100 μ l- og 500 μ l-mikrosprøjter.
 - 3.7. Cylindrisk filtertragt med G3-glasfritte (porøsitet 15-40 μ m), med en diameter på ca. 2 cm og en højde på ca. 5 cm, egnet til vakuumfiltrering og med et udvendigt konisk glasslib.
 - 3.8. Konisk vakuumkolbe (50 ml) med et indvendigt glasslib, som filtertragten (punkt 3.7) kan monteres på.
 - 3.9. 10 ml-reagensglas med konisk bund og tætsluttende prop.
 - 3.10. Gaskromatograf, som kan bruges med kapillarkolonne (med splitningssystem), og som består af:
 - 3.10.1. et termostatkammer til kolonner, som kan opretholde den ønskede temperatur med en nøjagtighed på ± 1 °C
 - 3.10.2. en injektionsenhed med temperaturindstilling, et fordampningselement af silanglas og splitningssystem
 - 3.10.3. en flammeioniseringsdetektor (FID)
 - 3.10.4. et dataopsamlingsystem, som kan bruges med FID-detektoren (punkt 3.10.3.), og som kan integreres manuelt.
 - 3.11. En kapillarkolonne af kvartsglas med en længde på 20 til 30 m, en indre diameter på 0,25 til 0,32 mm, helt overtrukket med en blanding af 5 % diphenyl og 95 % dimethylpolysiloxan (SE 52- eller SE 54-væske eller tilsvarende) i en ensartet tykkelse på mellem 0,10 og 0,30 μ m.

▼ M26

- 3.12. 10 µl-mikrosprøjte til gaskromatografi med cementeret nål, der kan bruges til splitinjektion.
- 3.13. Calciumchlorid-ekssikkator.
4. REAGENSER
- 4.1. Kaliumhydroxid, minimum titer 85 %.
- 4.2. Opløsning af kaliumhydroxid i ethanol, ca. 2 N.
130 g kaliumhydroxid (punkt 4.1) opløses i 200 ml destilleret vand under afkøling, og der fyldes op med ethanol til 1 liter (punkt 4.10). Opløsningen opbevares i veltilproppede, mørke glasflasker i højst to dage.
- 4.3. Ethylether (analysekvalitet).
- 4.4. Opløsning af kaliumhydroxid i ethanol, ca. 0,2 N.
13 g kaliumhydroxid (punkt 4.1) opløses i 20 ml destilleret vand, og der fyldes op med ethanol til 1 liter (punkt 4.10).
- 4.5. Vandfrit natriumsulfat (analysekvalitet).
- 4.6. Glasplader (20 x 20 cm) belagt med kiselgel uden fluorescensindikator, tykkelse 0,25 mm (kan fås brugsfærdige i handelen).
- 4.7. Toluen (kromatografikvalitet).
- 4.8. Acetone (kromatografikvalitet).
- 4.9. n-Hexan (kromatografikvalitet).
- 4.10. Ethylether (kromatografikvalitet).
- 4.11. Ethanol (analysekvalitet).
- 4.12. Ethylacetat (analysekvalitet).
- 4.13. Referenceopløsning til tyndtlagskromatografi: kolesterol eller phytosteroler og 5 % erytrodiolopløsning i ethylacetat (punkt 4.11).
- 4.14. 2,7-dichlorfluorescein, 0,2 %-opløsning i ethanol. Gøres svagt basisk ved tilsætning af nogle få dråber alkoholisk 2 N-kaliumhydroxidopløsning (punkt 4.2).
- 4.15. Vandfri pyridin (kromatografikvalitet) (se note 5).
- 4.16. Hexamethyl-disilazan (analysekvalitet).
- 4.17. Trimethylchlorsilan (analysekvalitet).
- 4.18. Prøveopløsninger af sterol-trimethylsilylethere.
Friskfremstilles ud fra steroler og erytrodiol udvundet af sterol- og erytrodiolholdige olier.
- 4.19. α -cholestanol, renhed over 99 % (renhed skal kontrolleres ved hjælp af GC-analyse).
- 4.20. α -cholestanol, intern standardopløsning, 0,2 %-opløsning (m/V) i ethylacetat (punkt 4.11).
- 4.21. Phenolphthaleinopløsning, 10 g/l i ethanol (punkt 4.10).
- 4.22. Bæregas: hydrogen eller helium, gaskromatografikvalitet.
- 4.23. Hjælpegasser: hydrogen, helium, nitrogen og luft, gaskromatografikvalitet.

▼ M26

- 4.24. n-Hexan (punkt 4.9)/ethylether (punkt 4.10) i forholdet 65:35 (V/V).
- 4.25. Silyleringsreagens bestående af en blanding i forholdet 9:3:1 (V/V/V) af pyridin/hexamethyl-disilazan/trimethyl-chlorsilan.

5. FREMGANGSMÅDE

- 5.1. Fremstilling af ikkeforsæbeligt stof:

- 5.1.1. Et rumfang α -cholestanol i intern standardopløsning (punkt 4.20), der indeholder en mængde cholestanol svarende til ca. 10 % af prøvens sterolindhold, overføres til 250 ml-kolben (punkt 3.1) ved hjælp af en 500 μ l-mikrosprøjte (punkt 3.6). Hvis der er tale om en olivenolieprøve på 5 g, tilsættes der f.eks. 500 μ l α -cholestanolopløsning (punkt 4.20), og hvis der er tale om olie fra olivenpresserester, tilsættes der 1 500 μ l. Prøven inddampes til tørhed i en svag nitrogenstrøm i varmt vandbad. Efter nedkøling af kolben afvejes $5 \pm 0,01$ g af den tørrede filtrerede prøve til den samme kolbe.

Note 1: Animalske eller vegetabiliske olier og fedtstoffer, der indeholder betydelige mængder kolesterol, kan vise en top, der har næsten samme retentionstid som cholestanol. Hvis det forekommer, skal sterolfractionen analyseres to gange med og uden intern standard.

- 5.1.2. Tilsæt 50 ml 2 N-opløsning af kaliumhydroxid i ethanol (punkt 4.2) og pimpsten, påsæt refluxvaleren, og opvarm til svag kogning, indtil forsæbningen sker (opløsningen bliver klar). Opvarmningen fortsættes i endnu 20 minutter. Derefter tilsættes 50 ml destilleret vand fra den øverste del af svaleren, svaleren tages af, og kolben afkøles til ca. 30 °C.
- 5.1.3. Overfør kolbens indhold kvantitativt til en 500 ml-skilletragt (punkt 3.2), idet der skylles flere gange med destilleret vand (50 ml). Tilsæt ca. 80 ml ethylether (punkt 4.10), og ryst kraftigt i ca. 60 sekunder, idet presset regelmæssigt frigives ved at vende skilletragten på hovedet og åbne stophanen. Lad skilletragten henstå, indtil fuldstændig separation af de to faser er opnået (note 2).

Aftap derefter så meget af sæbeopløsningen som muligt i en anden skilletragt. Foretag endnu to ekstraktioner på den vandige/alkoholholdige fase på samme måde, idet der bruges 60 til 70 ml ethylether (punkt 4.10).

Note 2: Eventuel emulsion kan ødelægges ved tilsætning af små mængder ethanol (punkt 4.11).

- 5.1.4. De tre etherekstrakter samles i en enkelt skilletragt, der indeholder 50 ml vand. Vask med vand (50 ml), indtil vaskevandet ikke længere bliver lyserødt, når der tilsættes en dråbe af phenolphthaleinopløsningen (punkt 4.21).

Når vaskevandet er hældt af, filtreres på vandfrit natriumsulfat (punkt 4.5) ned i en på forhånd vejret 250 ml kolbe, idet tragt og filter vaskes med små mængder ethylether (punkt 4.10).

- 5.1.5. Opløsningen inddampes ved destillation i en rotationsfordamper ved 30 °C under vakuum. Tilsæt 5 ml acetone, og fjern det flygtige opløsningsmiddel fuldstændigt i en svag luftstrøm. Tør reststoffet i ovnen ved 103 ± 2 °C i 15 minutter. Afkøl i en ekssikkator, og afvej til nærmeste 0,1 mg.

▼ M26

- 5.2. Separation af sterol- og triterpentialkoholfraktionen (erytrodiol + uvaol)
- 5.2.1. Fremstilling af basiske plader til tyndtlagskromatografi. Kiselgelpladerne (punkt 4.6) nedsænkes ca. 4 cm i 0,2 N-opløsningen af kaliumhydroxid i ethanol (punkt 4.5) i 10 sekunder. Derefter får de lov at tørre i et stinkskaab i to timer og sættes til sidst i en ovn ved 100 °C i en time.

Pladerne tages ud af ovnen og opbevares i en eksikkator med calciumchlorid (punkt 3.13), indtil de skal bruges (plader, der er behandlet på denne måde, skal anvendes inden 15 dage).

Note 3: Når basiske kiselgelplader benyttes til at separere sterolfraktionen, er det ikke nødvendigt at behandle den ikkeforsæbelige fraktion med aluminiumoxid. På denne måde holdes alle sure forbindelser (fedtsyrer og andre) tilbage på basislinjen, og sterolbåndet er klart adskilt fra de alifatiske og triterpene alkoholors bånd.

- 5.2.2. Hæld en hexan/ethyletherblanding (punkt 4.24) (note 4) i kromatografikammeret til en dybde på ca. 1 cm. Sæt låg på kammeret, og lad det henstå således et køligt sted i mindst en halv time, så der opnås ligevægt mellem væske og damp. Strimler af filterpapir, der dypper ned i eluenten, kan anbringes på kammerets indre overflader. Dette reducerer elueringstiden med ca. 1/3 og giver en mere ensartet og regelmæssig eluering af komponenterne.

Note 4: Kromatografiblandingen udskiftes for hver test for at opnå fuldstændig reproducerbare elueringsbetingelser. Alternativt kan en opløsning på 50:50 (V/V) n-hexan/ethylether anvendes.

- 5.2.3. Fremstil en ca. 5 %-opløsning af de ikkeforsæbelige stoffer (punkt 5.1.5) i ethylacetat (punkt 4.12). Med 100 µl-mikrosprøjten afsættes 0,3 ml af opløsningen på en smal og ensartet streg nederst (ca. 2 cm) på kromatografipladen (punkt 5.2.1). På linje med stregen afsættes 2 til 3 µl af referenceopløsningen (punkt 4.13), så sterol- og triterpentialkoholbåndet kan identificeres efter eluering.

- 5.2.4. Anbring pladen i kromatografikammeret, som er forberedt som angivet i 5.2.2. Omgivelsestemperaturen bør holdes mellem 15 og 20 °C (note 5). Kammeret lukkes straks med låget, og der elueres, indtil opløsningsmiddelfronten er ca. 1 cm fra pladens øverste kant. Tag derefter pladen ud af kromatografikammeret, og lad opløsningsmidlet fordampe i en strøm af varm luft eller ved at lade pladen stå en kort tid i et stinkskaab.

Note 5: Højere temperatur kan forringe separationen.

- 5.2.5. Pladen sprøjtes let og ensartet med 2,7-dichlorfluoresceinopløsningen (punkt 4.14), hvorefter den henstår til tørring. Når pladen observeres under ultraviolet lys, kan sterol- og triterpentialkoholbåndet identificeres ved, at det er på linje med de pletter, der er afsat ved hjælp af referenceopløsningen (punkt 4.13). Båndets grænser langs fluorescenckanterne markeres med en sort blyant (se tyndtlagskromatografipladen i figur 3).

- 5.2.6. Med en metalspatel skrubes kiselgelen i det markerede område af. Det fjernede materiale pulveriseres fint og hældes i filtertragten (punkt 3.7). Tilsæt 10 ml varm ethylacetat, bland det omhyggeligt med metalspatelen, og filtrer under vakuum; filtratet opsamles i den koniske kolbe (punkt 3.8), der er sat på filtertragten.

▼ M26

Reststoffet i kolben vaskes tre gange med ethylether (punkt 4.3) (ca. 10 ml hver gang), idet filtratet opsamles i den samme kolbe, der er påsat filtertragten. Filtratet inddampes til et rumfang af 4 til 5 ml. Den tilbageværende opløsning overføres til det på forhånd vejede 10 ml-reagensglas (punkt 3.9). Inddamp til tørhed ved let opvarmning i en svag strøm af nitrogen, fyld op med et par dråber acetone (punkt 4.8), og inddamp igen til tørhed.

Reststoffet i reagensglasset skal bestå af sterol- og triterpendialkoholfraktionen.

5.3. Fremstilling af trimethylsilylethere

5.3.1. Tilsæt silyleringsreagenset (punkt 4.25) (note 6) i forholdet 50 µl for hvert milligram steroler og triterpendialkoholer til reagensglasset med sterol- og triterpenfraktionen, idet enhver optagelse af fugt undgås (note 7).

Note 6: Opløsninger klar til brug fås i handelen. Man kan også få andre silyleringsreagenser, som f.eks. bis-trimethylsilyltrifluoracetamid + 1 % trimethylchlorsilan, som skal fortyndes med et lige så stort rumfang vandfri pyridin.

Pyridin kan erstattes med samme mængde acetonitril.

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

Note 7: Den lette opalivering, som kan fremkomme, er normal og giver ikke anledning til interferens. Hvis der dannes hvide fnug eller fremkommer en lyserød farve, er det tegn på tilstedeværelsen af fugt eller svækkelse af reagenset. Hvis det forekommer, skal testen gentages (kun hvis hexamethylidisilazan/trimethylchlorsilan anvendes).

5.4. Gaskromatografisk analyse.

5.4.1. Forberedende operationer, konditionering af kolonnen.

5.4.1.1. Kolonnen (punkt 3.11) monteres i gaskromatografen, idet indløbsenden forbindes med splitinjektoren, og udløbsenden forbindes med detektoren.

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

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

▼ **M26**

Negativ glidning af en lige linje tyder på lækage fra kolonnens forbindelser. Positiv glidning tyder på utilstrækkelig konditionering af kolonnen.

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

5.4.2. Valg af driftsbetingelser.

5.4.2.1. Følgende driftsbetingelser anvendes:

- kolonnetemperatur: 260 ± 5 °C
- injektortemperatur: 280-300 °C
- detektortemperatur: 280-300 °C
- bæregassens lineære hastighed: helium 20-35 cm/s, hydrogen 30-50 cm/s
- splitterforhold: fra 1:50 til 1:100
- instrumentets følsomhed: fra 4 til 16 gange den minimale dæmpning
- registreringsfølsomhed: 1-2 mV fuld skala
- indsprøjtet mængde: 0,5-1 µl TMSE-opløsning.

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

- Retentionstiden for β -sitosteroltoppen bør være 20 ± 5 minutter.
- Campesteroltoppen bør være: for olivenolie (gennemsnitsindhold 3 %) 20 ± 5 % af fuld skala; for sojaolie (gennemsnitsindhold 20 %) 80 ± 10 % af fuld skala.
- Alle tilstedeværende steroler skal adskilles. Desuden skal toppene også være fuldstændig opløst, dvs. hver tops spor skal gå tilbage til basislinjen, før sporet går op til den næste top. Ufuldstændig opløsning kan dog tolereres, såfremt toppen ved RRT (relativ retentionstid) 1,02 (Sitostanol) kan bestemmes kvantitativt ved brug af den vinkelrette linje.

5.4.3. Analytisk fremgangsmåde

5.4.3.1. Med 10 µl-mikrosprøjten optages 1 µl hexan, derefter trækkes først 0,5 µl luft og derefter 0,5 til 1 µl af prøveopløsningen op. Stemplet trækkes længere ud, så kanylen tømmes. Kanylen trykkes gennem injektorens membran, og efter 1-2 sekunder injiceres hurtigt; derefter fjernes kanylen langsomt efter ca. 5 sekunder.

Der kan også anvendes en automatisk injektor.

5.4.3.2. Registreringen fortsættes, indtil de tilstedeværende triterpendialkohlere TMSE er fuldstændig elueret. Basislinjen skal fortsat opfylde kravene (punkt 5.4.1.2).

5.4.4. Identifikation af toppe

De enkelte toppe identificeres ud fra retentionstiderne og ved sammenligning med blandinger af sterol- og triterpendialkohol-TMSE, der er analyseret under de samme betingelser (se tillægget).

▼ M26

Sterolerne og triterpendialkoholerne elueres i følgende rækkefølge: cholesterol, brassicasterol, ergosterol, 24-methylen-cholesterol, campesterol, campestanol, stigmasterol, $\Delta 7$ -campesterol, $\Delta 5,23$ -stigmastadienol, clerosterol, β -sistosterol, sitostanol, $\Delta 5$ -avenasterol, $\Delta 5,24$ -stigmastadienol, $\Delta 7$ -stigmastenol, $\Delta 7$ -avenasterol, erythrodiol og uvaol.

Retentionstiderne for β -sitosterol for SE 52- og SE 54-kolonner er vist i tabel 1.

Figur 1 og 2 viser typiske kromatogrammer for bestemte olier.

5.4.5. Kvantitativ vurdering

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

5.4.5.2. Koncentrationen af hver enkelt sterol beregnes i mg/kg fedtstof som følger:

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

hvor:

A_x = toparealet for sterol x i computerenheder

A_s = toparealet for α -cholestanol i computerenheder

m_s = massen af tilsat α -cholestanol i milligram

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

6. RAPPORTERING AF RESULTATERNE

6.1. De individuelle sterolkoncentrationer angives som mg/kg fedtstof og deres sum som "steroler i alt".

Sammensætningen af hver af de individuelle steroler samt af erythrodiol og uvaol angives med en decimal.

Den samlede sterolsammensætning udtrykkes uden decimaler.

▼ M28

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

$$\text{sterol}_x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

hvor:

A_x = topareal x

$\sum A$ = summen af toparealet for steroler.

▼ M26

6.3. Tilsyneladende β -sitosterol: $\Delta 5$ -23-stigmastadienol + clerosterol + β -sitosterol + sitostanol + $\Delta 5$ -avenasterol + $\Delta 5$ -24-stigmastadienol.

▼M26

- 6.4. Den procentvise andel af erythrodiol og uvaol beregnes:

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

hvor:

ΣA = samlet areal for sterol i computerenheder

Er = areal af erythrodiol i computerenheder

Uv = areal af uvaol i computerenheder

▼ **M26***Tillæg***Bestemmelse af gassens lineære hastighed**

Med gaskromatografen indstillet på normale driftsbetingelser injiceres 1 til 3 µl methan (eller propan), og man måler den tid, det tager for gassen at passere gennem kolonnen fra tidspunktet for injektionen til det tidspunkt, hvor toppen fremkommer (tM).

Den lineære hastighed i cm/s beregnes ved formlen L/tM , hvor L er kolonnens længde i cm, og tM er den målte tid i sekunder.

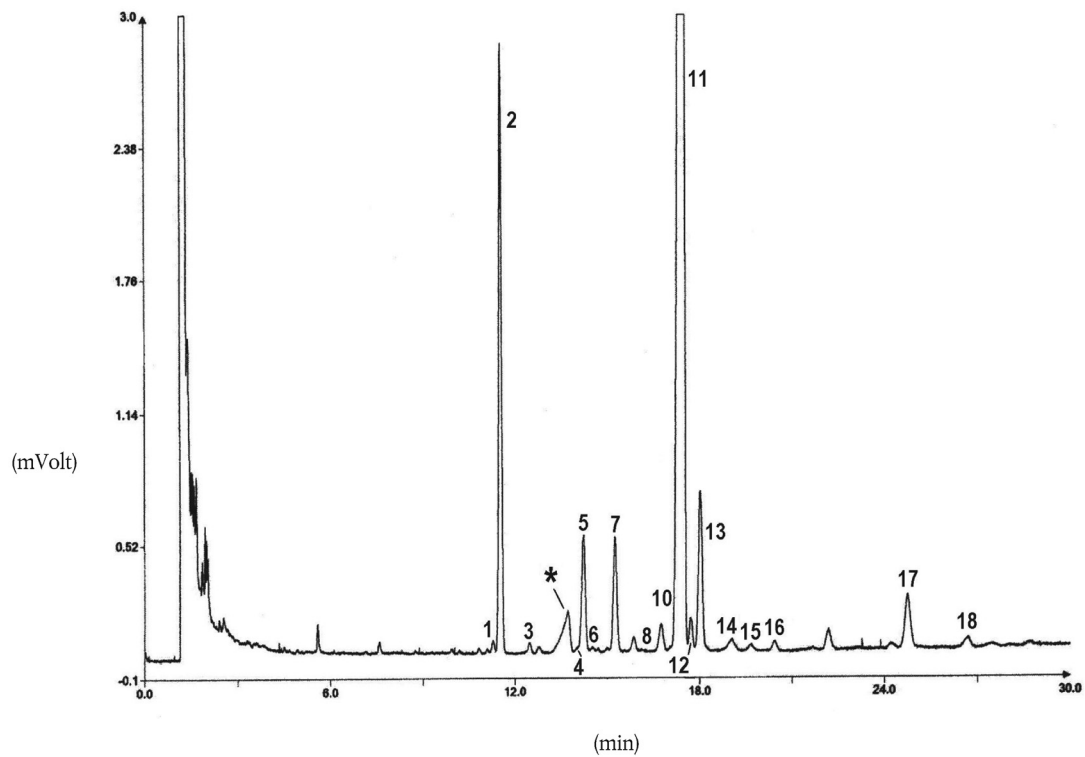
*Tabel 1***Relative retentionstider for steroler**

Top	Identifikation		Relativ retentions-tid	
			SE 54-kolonne	SE 52-kolonne
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 methy 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
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-12en-3 β 28 diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-ursen-3 β 28 diol	1,52	1,52

▼ M26

Figur 1

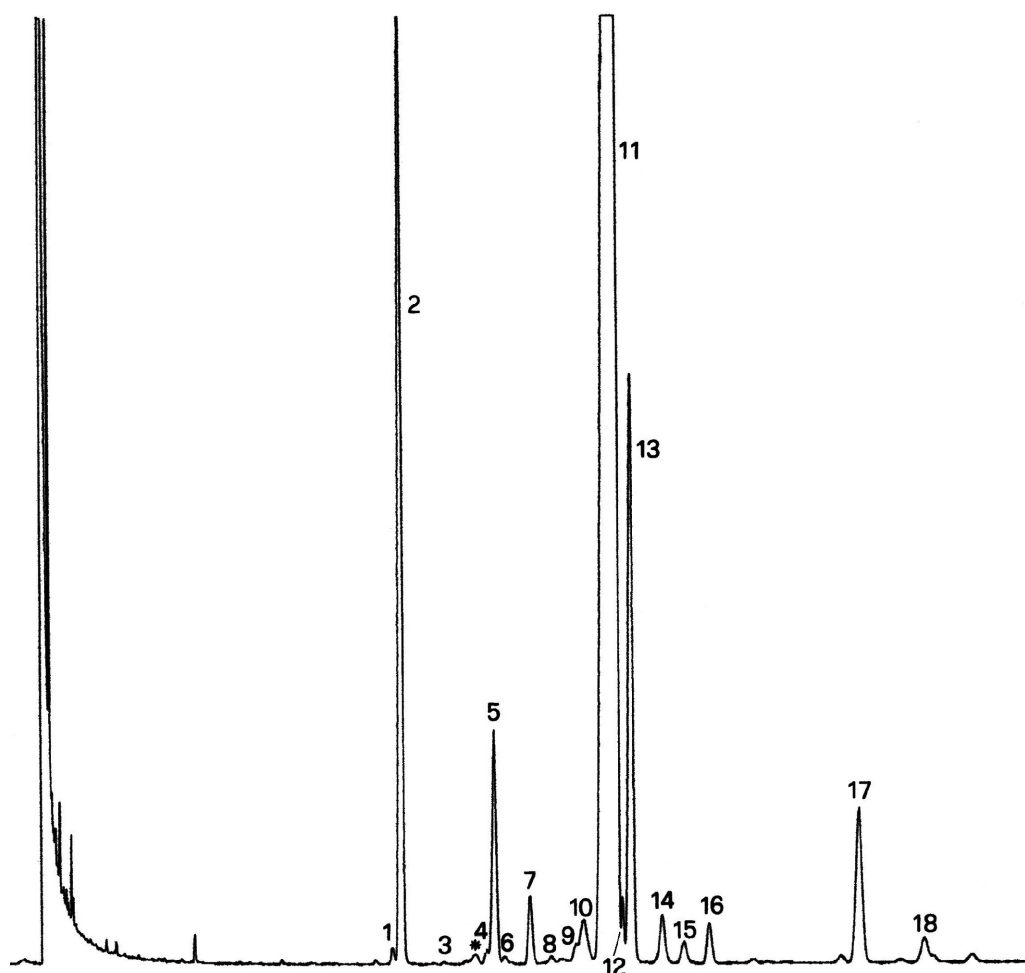
Gaskromatogram af sterol- og triterpentialkoholfractionen af bomolie (tilsat intern standard)



▼ M26

Figur 2

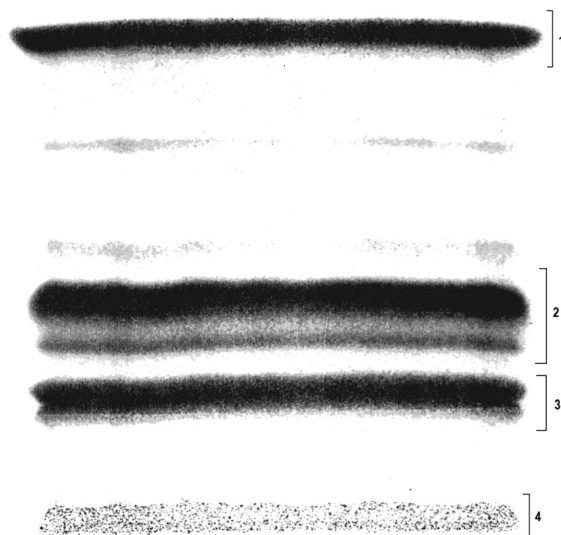
Gaskromatogram af sterol- og triterpentialkoholfraktionen af en raffineret olivenolie (tilsat intern standard)



▼ M26

Figur 3

Tyndtlagskromatografiplade med olie fra olivenpresserester med den zone, der skal skraves med henblik på bestemmelse af steroler og triterpendialkoholer



- 1 – Squalen
- 2 – Triterpen og alifatiske alkoholer
- 3 – Steroler og triterpendialkoholer
- 4 – Start og frie fedtsyrer

▼ **M21***BILAG VII***BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF 2-GLYCERYLMONOPALMITAT
I PROCENT**

1. GENSTAND OG ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden er en analyseprocedure for bestemmelse af det procentvise indhold af palmitinsyre i 2-stillingen i triglycerider ved måling af 2-glycerylmonopalmitat.

Metoden kan anvendes på vegetabiliske olier, der er flydende ved stuetemperatur (20 °C).
2. PRINCIP

Olieprøven behandles efter forberedelsen med pankreaslipase, som specifikt hydrolyserer triglyceridets 1- og 3-stilling og efterlader 2-monoglycerider. Det procentvise indhold af 2-glycerylmonopalmitat i monoglyceridfraktionen bestemmes efter silylering ved gaskromatografi med kapillarkolonne.
3. APPARATUR OG SÆDVANLIGT UDSTYR
 - 3.1. 25 ml erlenmeyerkolbe
 - 3.2. 100, 250 og 300 ml bægerglas
 - 3.3. kromatografikolonne af glas, indvendig diameter 21-23 mm og længde 400 mm, med sintret glasfilter og hane
 - 3.4. 10, 50, 100 og 200 ml måleglas
 - 3.5. 100 og 250 ml rundbandede kolber
 - 3.6. rotationsfordamper
 - 3.7. 10 ml centrifugeglas med konisk bund og slibprop
 - 3.8. centrifuge til 10 og 100 ml glas
 - 3.9. termostat, der kan holde en temperatur på $40 \pm 0,5$ °C
 - 3.10. 1 og 2 ml målepipetter
 - 3.11. 1 ml injektionssprøjte
 - 3.12. 100 µl mikroinjektionssprøjte
 - 3.13. 1 000 ml skilletragt
 - 3.14. gaskromatograf til kapillarkolonner med kold »on column«-injektor til direkte indsprøjtning af prøven i kolonnen og med en ovn, der kan fastholde den ønskede temperatur inden for ca. 1 °C.
 - 3.15. kold »on column«-injektor til direkte indsprøjtning af prøven i kolonnen
 - 3.16. flammeioniseringsdetektor og elektrometer
 - 3.17. skriver-integrator, der passer til elektrometeret, med responstid højst 1 sekund og variabel papirhastighed
 - 3.18. kapillarkolonne af glas eller sintret kvarts, længde 8-12 m og indvendig diameter 0,25-0,32 mm, coatet med 5 % methylpolysiloxan eller phenylmethylpolysiloxan i en lagtykkelse på 0,10-0,30 µm, og brugbar op til 370 °C

▼ M21

- 3.19. 10 µl mikroinjektionssprøjte med hærdet kanyle, længde mindst 7,5 cm, til indsprøjtning direkte i kolonnen.
4. REAGENSER
- 4.1. silicagel med kornstørrelse 63-200 µm (70/280 mesh), tilberedt således: Silicagelen anbringes i en porcelænsskål, tørres i ovn ved 160 °C i fire timer og afkøles til stuetemperatur i eksikkator. Der tilsættes 5 % vand til silicagelen på følgende måde: I en erlenmeyerkolbe afvejes 152 g silicagel, og der tilsættes 8 g destilleret vand; kolben tilproppes og rystes forsigtigt, indtil vandet er jævnt fordelt. Henstår i mindst 12 timer inden brugen.
- 4.2. n-hexan (til kromatografi)
- 4.3. isopropanol
- 4.4. isopropanol, vandig opløsning 1:1 (v/v)
- 4.5. pankreaslipase. Den anvendte lipase skal have en aktivitet på 2,0-10 lipaseenheder pr. mg. (Der er pankreaslipaser i handelen med en aktivitet på 2-10 enheder pr. mg enzym.)
- 4.6. bufferopløsning af trishydroxymethylaminomethan: 1 M vandig opløsning indstillet til pH 8 (potentiometrisk måling) med koncentreret HCl (1:1, v/v)
- 4.7. natriumcholat, enzymkvalitet, 0,1 % vandig opløsning (opløsningen skal bruges inden for to uger)
- 4.8. calciumchlorid, 22 % vandig opløsning
- 4.9. diethylether til kromatografi
- 4.10. elueringsvæske: blanding af n-hexan og diethylether, 87:13 (v/v)
- 4.11. natriumhydroxid, 12 % opløsning (w/w)
- 4.12. phenolphthalein, 1 % opløsning i ethanol
- 4.13. bæregas: hydrogen eller helium, til gaskromatografi
- 4.14. hjælpegasser: hydrogen, mindst 99 % ren, fri for vand og organisk materiale, og luft af samme renhed, til kromatografi
- 4.15. silyleringsreagens: blanding af pyridin, hexamethylsilazan og trimethylchlorsilan 9:3:1 (v/v/v). (Der fås brugsklare opløsninger i handelen. Der kan også benyttes andre silyleringsreagenser, f.eks. bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid + 1 % trimethylchlorsilan, fortyndet med samme volumen vandfri pyridin.)
- 4.16. Referenceopløsninger: rene monoglycerider eller blandinger af monoglycerider med kendt procentvis sammensætning af omtrent samme størrelse som prøven.
5. FREMGANGSMÅDE
- 5.1. **Prøveforberedelse**
- 5.1.1. Olier med under 3 % frie syrer behøver ikke at neutraliseres inden kromatograferingen på silicagelkolonne. Olier med mere end 3 % frie syrer neutraliseres som beskrevet i punkt 5.1.1.1.

▼ M21

- 5.1.1.1. Der anbringes 50 g olie og 200 ml n-hexan i skilletragten på 1 000 ml (3.13). Der tilsættes 100 ml isopropanol og en mængde 12 % natriumhydroxidopløsning (4.11), der svarer til oliens indhold af frie syrer forhøjet med 5 %. Der rystes kraftigt i 1 minut. Derefter tilsættes der 100 ml destilleret vand, og efter fornyet omrystning sættes skilletragten til side.

Efter separation tappes det nedre lag med sæberne af. Eventuelle mellemlag (slim og uopløselige stoffer) fjernes. Hexanopløsningen af neutraliseret olie vaskes flere gange med portioner af isopropanol/-vand-opløsningen (4.4) a 50-60 ml, indtil phenolphthaleinets lyserøde farve er forsvundet.

Det meste af hexanen fjernes ved vakuumdestillation (f.eks. rotationsfordamper), og olien overføres til en 100 ml rundbundet kolbe (3.5). Olien inddampes til fuldstændig tørhed under vakuum.

Herefter skal oliens syreindhold være mindre end 0,5 %.

- 5.1.2. I en 25 ml erlenmeyerkolbe (3.1) anbringes 1,0 g olie, som er behandlet som beskrevet ovenfor, og den opløses i 10 ml elueringsvæske (4.10). Opløsningen henstår mindst 15 minutter inden kromatografering på silicagelkolonne.

Hvis opløsningen er uklar, centrifugeres den, så kromatografibetingelserne bliver optimale. (Der kan anvendes brugsklare patroner med 500 mg SPE-silicagel.)

- 5.1.3. *Fremstilling af kromatografikolonnen*

Der hældes ca. 30 ml elueringsvæske (4.10) i kolonnen (3.3), og i bunden af kolonnen placeres der ved hjælp af en glasstav et stykke vat, som luften trykkes ud af.

I et bægerglas fremstilles en opslæmning af 25 g silicagel (4.1) i ca. 80 ml elueringsvæske, og opslæmningen hældes på kolonnen gennem en tragt.

Når det er kontrolleret, at al silicagelen er kommet ned i kolonnen, skylles der med elueringsvæske (4.10), hanen åbnes, og der tappes væske af, indtil overfladen er ca. 2 mm over silicagelens overkant.

- 5.1.4. *Kolonnekromatografi*

I en 25 ml erlenmeyerkolbe (3.1) anbringes 1,0 g prøve, som er behandlet som beskrevet i punkt 5.1.

Prøven opløses i 10 ml elueringsvæske (4.10). Opløsningen overføres til kromatografikolonnen, der er fremstillet som beskrevet i punkt 5.1.3. Kolonnepakningens overflade må ikke forstyrres.

Der åbnes for hanen og aftappes elueringsmiddel, indtil prøveopløsningens overflade er på niveau med silicagelen. Der elueres med 150 ml elueringsvæske. Hastigheden sættes til 2 ml/min (dvs. at de 150 ml løber gennem kolonnen på ca. 60-70 minutter).

Eluatet opsamles i en tareret 250 ml rundbundet kolbe. Opløsningsmidlet afdampes under vakuum, og de sidste rester fjernes med en nitrogenstrøm.

Kolben vejes, og ekstraktmængden udregnes.

▼ M21

(Hvis der benyttes brugsklare SPE-silicagelpatroner, følges denne fremgangsmåde: 1 ml af opløsningen (5.1.2) sættes på patroner, der er forberedt med 3 ml n-hexan.

Når opløsningen er løbet igennem, elueres der med 4 ml n-hexan/-diethylether 9:1 (v/v).

Eluatet opsamles i et 10 ml glas og inddampes med en nitrogenstrøm til fuldstændig tørhed.

Remanensen behandles med pankreaslipase (5.2). Det er meget vigtigt, at fedtsyresammensætningen før og efter behandlingen på SPE-patronen kontrolleres.)

5.2. Hydrolyse med pankreaslipase

5.2.1. I centrifugeglasset afvejes 0,1 g olie, som er behandlet som beskrevet i punkt 5.1. Der tilsættes 2 ml bufferopløsning (4.6), 0,5 ml natriumcholatopløsning (4.7) og 0,2 ml calciumchloridopløsning, idet der omrøres omhyggeligt mellem hver tilsætning. Glasset lukkes med slibproppen og anbringes i termostaten ved $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2. Der tilsættes 20 mg lipase og omrystes omhyggeligt (uden at proppen fugtes), og glasset anbringes i termostaten i nøjagtig 2 minutter, hvorefter det tages op, rystes energisk i nøjagtig 1 minut og hensættes til afkøling.

5.2.3. Der tilsættes 1 ml diethylether, tilproppes og rystes energisk, og centrifugeres, hvorefter etheropløsningen overføres til et rent og tørt glas med en mikroinjektionssprøjte.

5.3. Fremstilling af silanderivater og gaskromatografi

5.3.1. Med en mikroinjektionssprøjte overføres 100 µl af opløsningen (5.2.3) til et 10 ml glas med konisk bund.

5.3.2. Opløsningsmidlet afdampes med en svag nitrogenstrøm, der tilsættes 200 µl silyleringsreagens (4.15), glasset tilproppes, og man lader det stå i 20 minutter.

5.3.3. Efter 20 minutter tilsættes der 1-5 ml n-hexan (alt efter kromatograferingsbetingelserne): Den fremkomne opløsning er klar til gaskromatografering.

5.4. Gaskromatografi

Der anvendes følgende arbejdsbetingelser:

— injektortemperatur (»on column«-injektor) under opløsningsmidlets kogepunkt (68 °C)

— detektortemperatur: 350 °C

— kolonnetemperatur: temperaturprogrammering af ovnen: 60 °C i 1 minut, derefter stigning først med 15 °C pr. minut indtil 180 °C og dernæst med 5 °C pr. minut indtil 340 °C, og endelig 340 °C i 13 minutter

— bæregas: hydrogen eller helium indstillet til en sådan lineær hastighed, at der opnås den i figur 1 viste opløsning. C₅₄-triglyceridet skal have en retentionstid på 40 ± 5 minutter (se figur 2). (Ovenstående arbejdsbetingelser er vejledende. Den enkelte analyseansvarlige må optimere dem for at opnå det ønskede resultat. Højden af toppen for 2-glycerylmonopalmitat skal være mindst 10 % af fuldt udslag på skriveren.)

▼ M21

— indsprøjtet mængde: 0,5-1 µl af opløsningen i (5 ml) n-hexan (5.3.3).

5.4.1. *Identifikation af toppene*

De enkelte monoglycerider identificeres efter deres retentionstider i prøveanalysen sammenlignet med tiderne fra analyse af standardmonoglyceridblandinger under samme betingelser.

5.4.2. *Kvantitativ vurdering*

Arealerne af toppene beregnes ved hjælp af integratoren.

6. ANGIVELSE AF RESULTATER

Det procentvise indhold af glycerylmonopalmitat beregnes ud fra forholdet mellem arealet af den pågældende top og summen af arealerne af samtlige monoglyceridtoppe (se figur 2) efter følgende formel:

$$\text{glycerylmonopalmitat (\%)}: \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

hvor:

A_x = arealet af den top, der svarer til glycerylmonopalmitat

ΣA = summen af arealerne af samtlige monoglyceridtoppe

Resultatet angives med én decimal.

7. ANALYSERAPPORT

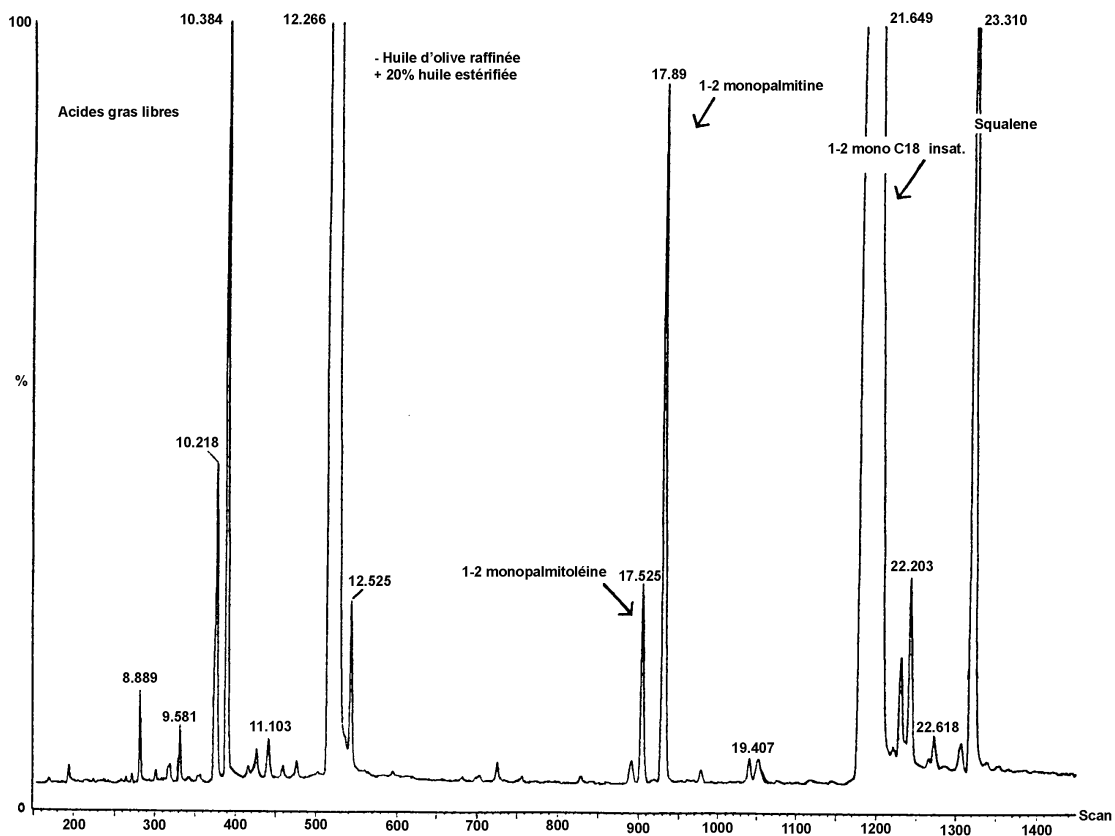
Analysereporten skal indeholde følgende:

- henvisning til denne metode
- alle oplysninger til fuldstændig identifikation af prøven
- resultatet af analysen
- alle afvigelser fra metoden, uanset om det er besluttet af de berørte parter eller har andre årsager
- nøje identifikation af laboratoriet, dato for udførelse af analysen og de ansvarliges underskrift.

▼ M21

Figur 1

Kromatogram af reaktionsprodukter fra silylering efter lipasebehandling af en raffineret olivenolie med tilsætning af 20 % forestret olie (100 %)



Signaturer: »acides gras libres« = frie fedtsyrer, »huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée« = raffineret olivenolie + 20 % forestret olie, »1-2 monopalmitoléine« = 1-2 monopalmitolein, »1-2 mono C₁₈ insat.« = umættet 1-2 mono-C₁₈.

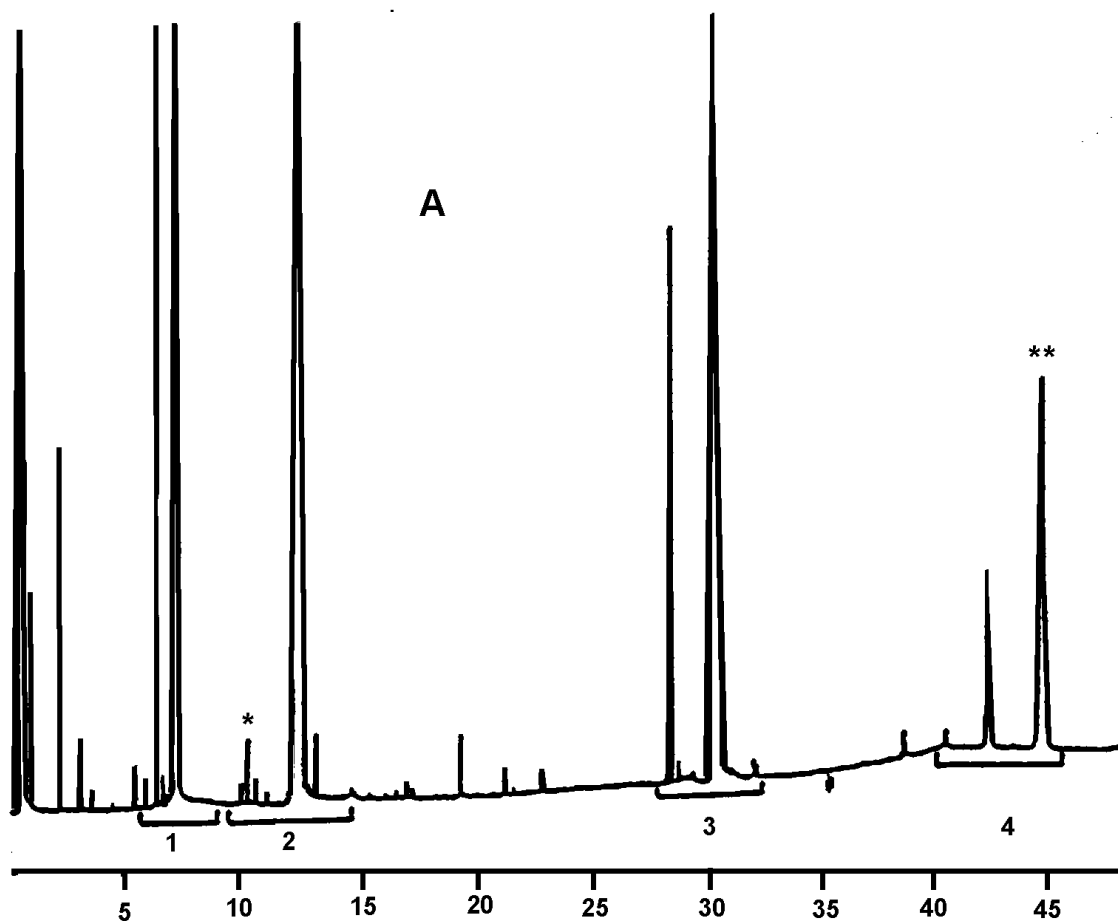
▼ **M21**

Figur 2

Kromatogram af:

A) ægte olivenolie, efter lipasebehandling og silylering; under de pågældende betingelser (kapillarkolonne 8-12 m) elueres voksfraktionen samtidig med eller kort tid efter diglyceridfraktionen.

Efter lipasebehandlingen bør triglyceridindholdet ikke være højere end 15 %



Signaturer:

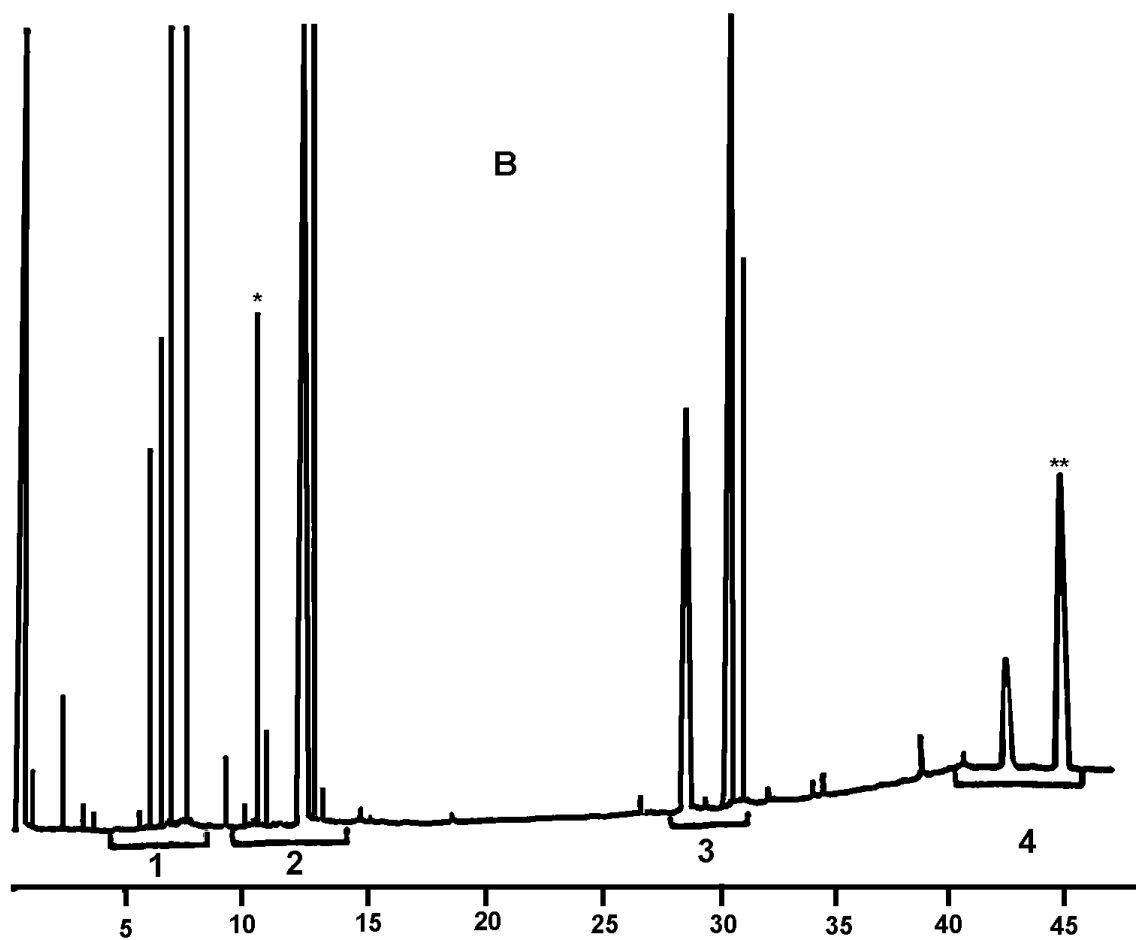
- 1 = Frie fedtsyrer
- 2 = Monoglycerider
- 3 = Diglycerider
- 4 = Triglycerider
- * = 2-monopalmitat
- ** = C₅₄-triglycerid

▼ M21

Kromatogram af:

B) forestret olie efter lipasebehandling og silylering; under de pågældende betingelser (kapillarkolonne 8-12 m) elueres voksfraktionen samtidig med eller kort tid efter diglyceridfraktionen.

Efter lipasebehandlingen bør triglyceridindholdet ikke være højere end 15 %



Signaturer:

- 1 = Friee fedtsyrer
- 2 = Monoglycerider
- 3 = Diglycerider
- 4 = Triglycerider
- * = 2-monopalmitat
- ** = C₅₄-triglycerid

▼ **M21**

8. NOTER

Note 1. FREMSTILLING AF LIPASE

Lipaser med tilfredsstillende aktivitet kan fås i handelen. De kan også fremstilles i laboratoriet på følgende måde:

5 kg frisk svinepankreas afkøles til 0 °C. Alt omgivende fedt og bindevæv fjernes, og vævet findeles i blender til en flydende pasta. Den omrøres i 4-6 timer med 2,5 l vandfri acetone, hvorefter den centrifugeres. Bundfaldet ekstraheres endnu tre gange med samme mængde vandfri acetone og derefter to gange med en blanding af acetone og diethylether (1:1) (v/v) og to gange med diethylether.

Bundfaldet tørres i 48 timer under vakuum til et stabilt pulver, som har lang holdbarhed ved opbevaring tørt i køleskab.

Note 2. TEST FOR LIPASEAKTIVITET

Der fremstilles en olivenolieemulsion på følgende måde:

I en mixer omrøres i 10 minutter en blanding af 165 ml af en gummi arabicum-opløsning med 100 g/l, 15 g knust is og 20 ml neutraliseret olivenolie.

I et 50 ml bægerglas hældes først 10 ml af denne emulsion og derefter 0,3 ml natriumcholatopløsning (0,2 g/ml) og 20 ml destilleret vand.

Bægerglasset anbringes i termostat ved 37 °C, og der nedsænkes en pH-meterelektrode og en propelomrører i bægerglasset.

Fra en burette tilsættes der dråbevis en 0,1 N natriumhydroxidopløsning, indtil pH er 8,3.

Der tilsættes en portion af opløsningen af lipasepulver i vand (0,1 g lipase pr. ml). Når pH-meteret viser et pH på 8,3, startes stopuret, og der tilsættes dråbevis så meget natriumhydroxidopløsning, at pH holdes på 8,3. Hvert minut noteres den forbrugte mængde natriumhydroxidopløsning.

Målingerne afsættes i et koordinatsystem med tiden som abscisse og det forbrugte antal ml 0,1 N natriumhydroxidopløsning som ordinat. Der skal fremkomme en ret linje.

Lipaseaktiviteten, målt i lipaseenheder pr. mg, beregnes efter følgende formel:

$$A = \frac{V \times N \times 100}{m}$$

hvor:

A er aktiviteten i lipaseenheder pr. mg

V er antallet af ml 0,1 N natriumhydroxidopløsning pr. minut (beregnet ud fra grafen)

N er natriumhydroxidopløsningens normalitet

m er mængden af tilsat lipase i mg.

Lipaseenheden er defineret som den mængde enzym, der frigør 10 mikroækvivalenter syre pr. minut.

▼ **M20**

▼ **M28***BILAG IX***Spektrofotometrisk undersøgelse ved ultraviolet lys**

INDLEDNING

Spektrofotometrisk undersøgelse ved ultraviolet lys kan give oplysninger om et fedtstofs kvalitet, dets konserveringstilstand og om forandringer frembragt ved teknologiske processer. Absorptionen ved de bølgelængder, der er specificeret i metoden, skyldes tilstedeværelsen af konjugerede dien- og triensystemer, der er resultatet af oxidationsprocesser og/eller raffineringsprocesser. Disse absorptioner er udtrykt som specifikke ekstinktioner $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (ekstinktionen for en 1 % w/v opløsning af fedtstoffet i det angivne opløsningsmiddel i en 10 mm kuvette), sædvanligvis betegnet ved K, (også kaldet ekstinktionskoefficienten).

1. OMRÅDE

I dette bilag beskrives fremgangsmåden for udførelse af en spektrofotometrisk undersøgelse af olivenolie i det ultraviolette område.

2. METODENS PRINCIP

En prøve opløses i det specificerede opløsningsmiddel, og opløsningens absorbans måles ved de fastsatte bølgelængder i forhold til rent opløsningsmiddel.

De specifikke ekstinktioner ved 232 og 268 nm i isooctan eller ved 232 og 270 nm i cyclohexan beregnes for en koncentration på 1 % w/v i en 10 mm kuvette.

3. APPARATUR

3.1. Et spektrofotometer til måling af ultraviolette bølgelængder (220 nm til 360 nm), med mulighed for aflæsning ved hver hele nanometer. Af hensyn til nøjagtigheden og reproducerbarheden anbefales det regelmæssigt at kontrollere spektrofotometerets absorbans- og bølgelængdeskala såvel som spildlys.

3.1.1. *Bølgelængdeskala*: Denne kan kontrolleres med et referencemateriale i form af et filter af optisk glas indeholdende holmiumoxid eller en opløsning af holmiumoxid (forseglet eller ikke), som har skarpt adskilte absorptionsbånd. Referencematerialet er beregnet til kontrol og kalibrering af bølgelængdeskalaen i spektrofotometre, der arbejder i det synlige og ultraviolette område og har en nominal spektral båndbredde på 5 nm eller derunder. Målingerne foretages med luft som blindprøve i bølgelængdeområdet fra 640 til 240 nm i henhold til de anvisninger, der er vedlagt referencematerialet. Ved hver ændring af spaltebredden korrigeres basislinjen med en tom strålegang. Bølgelængderne for standarden er anført i referencematerialets certifikat.

3.1.2. *Absorbansskala*: Den kan kontrolleres med kommercielt tilgængelige forseglede referencematerialer bestående af sure kaliumdichromatopløsninger i visse koncentrationer og med certificerede absorbansværdier ved λ_{max} (i form af fire opløsninger af kaliumdichromat i perchlorsyre, som er forseglet i fire UV-kvartskuvetter, dvs. måling af linearitet og fotometrisk nøjagtighed i UV-området). Efter korrektion af basislinjen måles kaliumdichromatopløsningerne mod en blindprøve af den anvendte syre i henhold til de anvisninger, der er vedlagt referencematerialet. Absorbansværdierne er anført i referencematerialets certifikat.

Fotocellens og fotomultiplikatorrørets respons kan også kontrolleres på følgende vis: 0,2000 g ren kaliumchromat til spektrofotometri afvejes og opløses i 0,05 N kaliumhydroxidopløsning i en 1 000 ml målekolbe, og der fyldes op til mærket. Der overføres præcis 25 ml af denne opløsning til en 500 ml målekolbe, som fortyndes op til mærket med den samme kaliumhydroxidopløsning.

▼M28

Derefter måler man denne opløsnings ekstinktion ved 275 nm med kaliumhydroxidopløsningen som reference. Den målte ekstinktion med en 1 cm kuvette skal være $0,200 \pm 0,005$.

- 3.2. Firkantede kvartskuvetter med låg, til måling af ultraviolette bølgelængder (220 til 360 nm), med en optisk vejlængde på 10 mm. Når kuvetterne er fyldt med vand eller et andet passende opløsningsmiddel, bør der ikke være forskelle på mere end 0,01 ekstinktionsenheder mellem dem.
- 3.3. 25 ml målekolbe, klasse A.
- 3.4. Analysevægt, hvorpå der kan aflæses ned til 0,0001 g.

4. REAGENSER

Under analysen må der kun benyttes reagenser af anerkendt analysekvalitet og destilleret eller demineraliseret vand eller vand af tilsvarende renhedsgrad, medmindre andet er anført.

Opløsningsmiddel: Isooctan (2,2,4-trimethylpentan) til målinger ved 232 nm og 268 nm og cyclohexan til målinger ved 232 nm og 270 nm, med en absorbans på mindre end 0,12 ved 232 nm og mindre end 0,05 ved 270 nm målt i en 10 mm kuvette med destilleret vand som reference.

5. FREMGANGSMÅDE

- 5.1. Prøven skal være fuldstændig homogen og fri for suspenderede urenheder. Er den ikke det, skal den filtreres på papir ved en temperatur på ca. 30 °C.
- 5.2. Ca. 0,25 g af den således forberedte prøve afvejes nøjagtigt (med 1 mg nøjagtighed) i en 25 ml målekolbe, der fyldes op til mærket med det angivne opløsningsmiddel, og opløsningen homogeniseres. Den fremkomne opløsning skal være fuldstændig klar. Ved opalescens eller uklarhed filtreres hurtigt på papir.

BEMÆRK: Generelt er en masse på 0,25-0,30 g tilstrækkeligt til at måle jomfruolivenoliers og ekstra jomfruolivenoliers absorbans ved 268 nm og 270 nm. Til målinger ved 232 nm er der almindeligvis behov for 0,05 g af prøven, så der forberedes normalt to særskilte opløsninger. Til målinger af absorbans i olier af olivenpresserester, raffinerede olivenolier og forfalskede olivenolier, er der almindeligvis behov for en mindre andel af prøven, f.eks. 0,1 g, da disse olier har en højere absorbans.

- 5.3. Hvis det er nødvendigt, korrigeres basislinjen (220-290 nm) med opløsningsmiddel i begge kvartskuvetter (prøve og reference). Derefter fyldes kvartskuvetten med prøven med prøveopløsningen, og ekstinktionerne måles ved 232, 268 og 270 nm mod det opløsningsmiddel, der anvendes som reference.

De aflæste ekstinktionsværdier skal ligge inden for området 0,1-0,8 eller inden for spektrofotometerens liniaritetsinterval, som bør kontrolleres. Gør de ikke det, gentages målingerne, idet der benyttes mere koncentrerede eller mere fortyndede opløsninger.

- 5.4. Efter måling af absorbansen ved 268 og 270 nm måles absorbansen ved λ_{\max} , $\lambda_{\max} + 4$ og $\lambda_{\max} - 4$. Disse absorbansværdier anvendes til at bestemme den specifikke ekstinktions variation (ΔK).

BEMÆRK: λ_{\max} anses for at være 268 nm for isooctan, der anvendes som opløsningsmiddel, og 270 nm for cyclohexan.

▼ M28

6. ANGIVELSE AF RESULTATERNE

- 6.1. Som måleresultat registreres den specifikke ekstinktion (ekstinktionskoefficient) ved de forskellige bølgelængder, som beregnes efter formlen:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s}$$

hvor:

$K\lambda$ = den specifikke ekstinktion ved bølgelængden λ

$E\lambda$ = den ekstinktion, der er målt ved bølgelængden λ

c = opløsningens koncentration i g pr. 100 ml

s = kvartskuvettens vejlængde i cm

angives med to decimaler.

- 6.2.
- Den specifikke ekstinktions variation (ΔK)*

Variationen i den absolutte værdi af den specifikke ekstinktion (ΔK) er givet ved:

$$\Delta K = \left| K_m - \left(\frac{K\lambda_m - 4 + K\lambda_m + 4}{2} \right) \right|$$

hvor K_m er den specifikke ekstinktion ved den bølgelængde, henholdsvis 270 nm og 268 nm, der giver maksimal absorption, afhængig af hvilket opløsningsmiddel der anvendes.

Resultaterne angives med to decimaler.

▼ **M28***BILAG X***BESTEMMELSE AF FEDTSYREMETHYLESTERE VED GASKROMATOGRAFI**

1. ANVENDELSESOMRÅDE

Dette bilag indeholder vejledning om bestemmelse ved gaskromatografi af frie og bundne fedtsyrer i vegetabiliske fedtstoffer og olier efter deres omdannelse til fedtsyremethylestere (FAME).

De bundne fedtsyrer af triacylglycerolerne (TAG) og, afhængig af esterificeringsmetoden, de frie fedtsyrer, omdannes til fedtsyremethylestere (FAME), som bestemmes ved gaskromatografi på kapillarkolonne.

Den metode, der er beskrevet i dette bilag, gør det muligt at bestemme FAME fra C₁₂ til C₂₄, herunder mættede, cis- og transenkelumættede og cis- og transflerumættede fedtsyremethylestere.

2. PRINCIP

Gaskromatografi anvendes til den kvantitative analyse af FAME. FAME fremstilles i henhold til del A. Derefter injiceres de i injektoren og inddampes i denne. Adskillelsen af FAME udføres på analytiske kolonner med specifik polaritet og længde. Til detektion af FAME anvendes en flammeionisationsdetektor. Testbetingelserne af angivet i del B.

Ved gaskromatografien af FAME med flammeionisationsdetektor kan hydrogen eller helium anvendes som bæregas (mobil fase). Hydrogen fremskynder adskillelsen og giver mere spidse toppe. Den stationære fase er et mikroskopisk lag af tynd flydende film på en inert fast overflade af kvartsglas.

Når de flygtiggjorte forbindelser, som analyseres, passerer gennem kapillarkolonnen, interagerer de med den stationære fase, som dækker overfladen på kolonnens inderside. Da de forskellige forbindelser interagerer på forskellig vis, eluerer de på forskellige tidspunkter. Dette kaldes forbindelsens retentionstid for et givet sæt analyseparametre. Sammenligningen af retentionstiderne anvendes til at bestemme de forskellige forbindelser.

DEL A

REMSTILLING AF METHYLESTERE AF FEDTSYRER FRA OLIVENOLIE OG OLIE AF OLIVENPRESSERESTER

1. OMFANG

I denne del beskrives fremstillingen af methylestere af fedtsyrer. Den omfatter metoder til fremstilling af methylestere af fedtsyrer fra olivenolie og olie af olivenpresserester.

2. ANVENDELSESOMRÅDE

Fremstillingen af fedtsyremethylestere fra olivenolie og olie af olivenpresserester udføres ved omestring med en methanopløsning af kaliumhydroxid ved stuetemperatur. Hvorvidt prøven skal renses før omestringen, afhænger fra prøvens indhold af frie fedtsyrer og af, hvilket analytisk parameter, der skal bestemmes. I den forbindelse kan følgende skema anvendes:

▼ **M28**

Oliekategori	Metode
Jomfruolivenolie med et syreindhold på $\leq 2,0$ %	1. Fedtsyrer
Raffineret olivenolie	2. Transfedtsyrer
Olivenolie bestående af raffineret olivenolie og jomfruolie	3. Δ ECN42 (efter rensning med silicagel SPE)
Raffineret olie af olivenpresserester	
Olie af olivenpresserester	
Jomfruolivenolie med et syreindhold på $> 2,0$ % Rå olie af olivenpresserester	1. Fedtsyrer (efter rensning med silicagel SPE)
	2. Transfedtsyrer (efter rensning med silicagel SPE)
	3. Δ ECN42 (efter rensning med silicagel SPE)

3. METODER

3.1. **Omestring med en opløsning af kaliumhydroxid i methanol ved stuetemperatur**3.1.1. *Princip*

Methylestre dannes ved omestring i en opløsning af kaliumhydroxid i methanol, hvilket er mellemstadiet inden forsæbning.

3.1.2. *Reagenser*

3.1.2.1. Methanol med højst 0,5 % (m/m) vand.

3.1.2.2. Hexan, til kromatografi.

3.1.2.3. Heptan, til kromatografi.

3.1.2.4. Diethylether, analyseren.

3.1.2.5. Acetone, til kromatografi.

3.1.2.6. Elueringsvæske til rensning af olien ved kolonne-/SPE-kromatografi, blanding af hexan/diethylether 87/13 (v/v).

3.1.2.7. Kaliumhydroxid, ca. 2 M opløsning i methanol: 11,2 g kaliumhydroxid opløses i 100 ml methanol.

3.1.2.8. Silicagelpatroner, 1 g (6 ml), til fastfaseekstraktion.

3.1.3. *Apparatur*

3.1.3.1. Reagensglas (volumen: 5 ml) med skrueprop med teflonpakning.

3.1.3.2. Målepipetter eller automatpipetter på 2 ml og 0,2 ml.

▼ **M28**3.1.4. *Rensning af olieprøver*

Om nødvendigt renses prøverne ved at føre olien gennem en silica-gelpatron til fastfaseekstraktion. En silicagelpatron (3.1.2.8) anbringes i et elueringsapparat til eluering under vakuum og skylles med 6 ml hexan (3.1.2.2). Skyllingen foretages uden vakuum. Derefter sættes der en opløsning af olien (ca. 0,12 g) i 0,5 ml hexan (3.1.2.2) på kolonnen. Opløsningen trænger ned i gelen og elueres derefter med 10 ml hexan/diethylether (87:13, v/v) (3.1.2.6). Eluaterne samles og blandes og deles i to lige store portioner. Den ene portion inddampes til tørhed på rotationsfordamper under reduceret tryk og ved stuetemperatur. Remanensen opløses i 1 ml heptan. Opløsningen er parat til gaskromatografisk analyse. Den anden portion inddampes, og remanensen opløses i 1 ml acetone til HPLC-triglyceridanalyse, hvis det er påkrævet.

3.1.5. *Fremgangsmåde*

I et 5 ml reagensglas med skrueprop (3.1.3.1) afvejes ca. 0,1 g af olieprøven. Der tilsættes 2 ml heptan (3.1.2.2) og rystes. Efter tilsætning af 0,2 ml kaliumhydroxidopløsningen i methanol (3.1.2.7) lukkes glasset med proppen med teflonpakning, og det rystes kraftigt i 30 sekunder. Glasset henstilles, indtil det øvre lag af opløsningen er blevet klart. Det øvre lag, som indeholder methylestrene, dekanteres fra. Heptanopløsningen er parat til injektion i gaskromatografen. Det tilrådes, at opløsningen opbevares i køleskab indtil kromatograferingen. Det frarådes at opbevare opløsningen i mere end 12 timer.

DEL B

ANALYSE AF FEDTSYREMETHYLESTERE VED GASKROMATOGRAFI

1. OMFANG

Denne del giver generelle retningslinjer for gaskromatografisk bestemmelse på kapillarkolonne af den kvalitative og kvantitative sammensætning af en blanding af fedtsyremethylestere fremstillet i henhold til den metode, der er angivet i del A.

Denne del gælder ikke for polymeriserede fedtsyrer.

2. REAGENSER

2.1. **Bæregas**

Inert gas (helium eller hydrogen) vel tørret og indeholdende mindre end 10 mg oxygen/kg.

Note 1: Hydrogen gør det muligt at foretage analysen dobbelt så hurtigt, men indebærer en risiko. Der forefindes sikkerhedsanordninger.

2.2. **Hjælpegasser**

2.2.1. Hydrogen (renhedsgrad $\geq 99,9$ %), fri for organiske urenheder.

2.2.2. Luft eller oxygen, fri for organiske urenheder.

2.2.3. Nitrogen (renhedsgrad > 99 %).

2.3. **Referencestandard**

En methylesterblanding af rene fedtsyrer eller methylestere af et fedtstof, der så vidt muligt har samme sammensætning som det fedtstof, der skal analyseres. Cis- og transisomerer af octadecen-, octadecadien- og octadecatrienmethylestere er nyttige til at bestemme transisomerer i umættede syrer.

Iltning af polyumættende fedtsyrer bør undgås.

▼ M28**3. APPARATUR**

Instruktionerne vedrører det sædvanlige udstyr til gaskromatografering med kapillarkolonne og flammeionisationsdetektor.

3.1. Gaskromatograf

Gaskromatografen skal omfatte følgende elementer:

3.1.1. Injektionssystem

Der benyttes et injektionssystem med kapillarkolonner, hvor injektionssystemet bør være specielt udformet til anvendelse med sådanne kolonner. Injektoren kan være med eller uden split.

3.1.2. Ovn

Ovnen skal være i stand til at opvarme kapillarkolonnen til en temperatur på mindst 260 °C og holde den valgte temperatur inden for 0,1 °C. Sidstnævnte er særlig vigtigt, når der anvendes rør af kvartsglas.

Det anbefales i alle tilfælde at anvende temperaturprogrammeret opvarmning, navnlig til fedtsyrer med mindre end 16 kulstofatomer.

3.1.3. Kapillarkolonne

3.1.3.1. Røret skal være af et materiale, som er inaktivt i forhold til de stoffer, der skal analyseres (normalt glas eller sintret kvarts). Den indre diameter skal være på mellem 0,20 mm og 0,32 mm. Den indvendige overflade skal undergå en passende behandling (f.eks. forbehandling, deaktivering), inden den stationære fasebelægning påføres. En længde på 60 m er tilstrækkeligt for fedtsyrer og cis- og transisomerer af fedtsyrer.

3.1.3.2. Stationær fase: polær polysiloxan (cyanopropylsilicone) og bundne (tværbundne) kolonner er velegnede.

Note 2: Der er risiko for, at polære polysiloxaner kan gøre det vanskeligt at identificere og adskille linolensyre og C₂₀-syrer.

Belægningerne skal være tynde, dvs. 0,1-0,2 µm.

3.1.3.3. Samling og konditionering af kolonnen

Der træffes de normale forholdsregler ved samlingen af kapillarkolonner, dvs. placering af kolonnen i ovnen (bærer), valg og montering af samlinger (tæthed), anbringelse af kolonnens ender i injektoren og detektoren (reduktion af dødvolumener). Kolonnen anbringes under en strøm af bæregas (f.eks. 0,3 bar (30 kPa) for en kolonne med en længde på 25 m og en indre diameter på 0,3 mm).

Kolonnen konditioneres ved temperaturprogrammering af ovnen ved 3 °C/min. fra den omgivende temperatur til en temperatur på 10 °C under den stationære fases dekomponeringsgrænse. Ovnen holdes på denne temperatur i 1 time, indtil basislinjen har stabiliseret sig. Den genindstilles på 180 °C, så der opnås isotermeriske betingelser.

Note 3: Korrekt prækonditionerede kolonner fås i handelen.

3.1.4. *Flammeioniseringsdetektor og omformer-forstærker*

3.2. Injektionsprøjte

Injektionsprøjten skal have en maksimumskapacitet på 10 µl med inddelinger på 0,1 µl.

3.3. Dataopsamlingsystem

Dataopsamlingsystem, som er forbundet online med detektorerne, og som anvendes sammen med et softwareprogram, der egner sig til integration og normalisering af toppe.

▼ **M28**

4. FREMGANGSMÅDE

4.1 til 4.3 angår anvendelse af en flammeionisationsdetektor.

4.1. **Prøvetingelser**4.1.1. *Valg af optimale driftsbetingelser for kapillarkolonne*

Grundet kapillarkolonns ydeevne og permabilitet afhænger adskillelsen mellem bestanddelene og analyseløbetiden stort set af bæregassens hastighed i kolonnen. Derfor vil det være nødvendigt at optimere driftsbetingelserne ved at justere disse parameter (eller, enklere, ved at mindske trykket ved kolonnetoppen) afhængig af, om formålet er at forbedre adskillelsen eller at foretage analysen hurtigere.

Følgende betingelser har vist sig at være velegnede til adskillelse af fedtsyremethylestere (C₄ til C₂₆). I tillæg B er der vist eksempler på kromatogrammer:

Injektortemperatur:	250 °C
Detektortemperatur:	250 °C
Ovntemperatur:	165 °C (8 minutter) til 210 °C ved 2 °C/min
Bæregas hydrogen:	tryk ved kolonnetop: 179 kPa
Samlet gennemstrømning:	154,0 ml/min.
Splitforhold	1:100
Injektionsvolumen:	1 µl

4.1.2. *Bestemmelse af opløsningen (se tillæg A)*

Opløsningen R af de to ved siden af hinanden liggende toppe I og II beregnes ved hjælp af formlen:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)}) / (\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ eller } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (United States Pharmacopeia),}$$

Eller

$$R = 1,18 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)})) \text{ (EP, BP, JP, DAB), (JP (Japanese Pharmacopeia), EP (Pharmacopée Européenne), (BP (British Pharmacopeia))}$$

hvor:

$d_{r(I)}$ er retentionsafstanden for top I

$d_{r(II)}$ er retentionsafstanden for top II

$t_{r(I)}$ er retentionstiden for top I

$t_{r(II)}$ er retentionstiden for top II

$\omega_{(I)}$ er bredden på basen af top I

$\omega_{(II)}$ er bredden på basen af top II

$\omega_{0,5}$ er bredden på toppen af den angivne forbindelse, ved midten af toppen

Hvis $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, beregnes R efter følgende formel:

$$R = (d_{r(II)} - d_{r(I)}) / \omega = (d_{r(II)} - d_{r(I)}) / 4\sigma$$

hvor:

σ er standardafvigelsen (se tillæg A, figur 1).

▼ **M28**

Hvis afstanden dr mellem de to toppe $d_{r(II)} - d_{r(I)}$ er lig med 4σ , er opløsningsfaktoren $R = 1$.

Hvis to toppe ikke er fuldstændig adskilt, skærer tangenterne til de to toppes infleksionspunkter hinanden i punkt C. For at adskille de to toppe fuldstændigt, skal afstanden mellem de to toppe være lig med:

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma \text{ som giver } R = 1,5 \text{ (se tillæg A, figur 3).}$$

5. ANGIVELSE AF RESULTATER

5.1. **Kvalitativ analyse**

Prøvens methylestertoppe identificeres ud fra kromatogrammet i tillæg B, figur 1, om nødvendigt ved interpolation eller ved sammenligning af dem med referenceblandingen af methylestere (som beskrevet i 2.3).

5.2. **Kvantitativ analyse**5.2.1. *Bestemmelse af sammensætningen*

Massefraktionen, w_i , for hver fedtsyremethylester, udtrykt i vægtprocent af methylestere beregnes som følger:

5.2.2. *Beregningsmetode*

5.2.2.1. Generelt

Indholdet af en given bestanddel i , udtrykt i vægtprocent methylestere, beregnes ved, at man bestemmer den procentdel, som den tilsvarende tops areal udgør i forhold til summen af arealerne af samtlige toppe, ud fra følgende formel:

$$w_i = (A_i/\Sigma A) \times 100$$

hvor:

A_i er arealet under toppen af den enkelte fedtsyremethylester i

ΣA er summen af arealerne under toppene af alle de enkelte fedtsyremethylestere.

Resultaterne angives med to decimaler.

Note 4: For fedtstoffer og olier er massefraktionen af fedtsyremethylestere lig med massefraktionen af triacylglycerolerne i gram pr. 100 g. I de tilfælde, hvor man ikke kan arbejde med denne antagelse, henvises til 5.2.2.2.

5.2.2.2. Anvendelse af korrektionsfaktorer

I visse tilfælde, f.eks. ved tilstedeværelse af fedtsyrer med mindre end otte kulstofatomer eller syrer med andre funktionelle grupper, korrigeres arealerne med specifikke korrektionsfaktorer (F_{ci}). Disse faktorer bestemmes for hvert enkelt instrument. Til dette formål anvendes dertil egnede referencematerialer med certificeret fedtsyresammensætning i det tilsvarende interval.

Note 5: Disse korrektionsfaktorer er ikke identiske med de teoretiske korrektionsfaktorer ved brug af flammeionisationsdetektor, som er angivet i tillæg A, da de også omfatter injektionssystemets ydelse m.m. I tilfælde af væsentlige forskelle bør hele systemets ydelse kontrolleres.

▼ M28

For denne referenceblanding udtrykkes vægtprocenten af FAME i ud fra formlen:

$$w_i = (m_i / \Sigma m) \times 100$$

hvor:

m_i er massen af FAME i i referenceblandingen

Σm er summen af masserne af referenceblandings forskellige bestanddele som fedtsyremethylestere.

Ud fra referenceblandings kromatogram beregnes arealprocenten for FAME i som følger:

$$w_i = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

hvor:

A_i er arealet af FAME i i referenceblandingen

ΣA er summen af alle arealer af alle fedtsyremethylestere i referenceblandingen.

Korrektionsfaktoren F_c er så

$$F_c = (m_i \times \Sigma A) / (A_i \times \Sigma m)$$

For prøven er vægtprocenten for hver FAME i :

$$w_i = (F_i \times A_i) / \Sigma (F_i \times A_i)$$

Resultaterne angives med to decimaler.

Note 6: Den beregnede værdi svarer til vægtprocenten af den enkelte fedtsyre beregnet som triacylglyceroler pr. 100 g fedtstof.

5.2.2.3. Anvendelse af en intern standard

I forbindelse med visse analyser (f.eks. når det ikke er alle fedtsyrerne, der er elueret, som det er tilfældet, når syrer med fire og seks kulstofatomer er til stede sammen med syrer med 16 og 18 kulstofatomer, eller når det er nødvendigt at bestemme den absolutte mængde af en fedtsyre i en prøve), er det nødvendigt at anvende en intern standard. Der benyttes ofte fedtsyrer med 5, 15 eller 17 kulstofatomer. Den eventuelle korrektionsfaktor for den interne standard bestemmes.

Vægtprocenten af bestanddel i , udtrykt som methylestere, bestemmes ud fra formlen:

$$w_i = (m_{IS} \times F_i \times A_i) / (m \times F_{IS} \times A_{IS})$$

hvor:

A_i er arealet af FAME i

A_{IS} er arealet af den interne standard

F_i er korrektionsfaktoren for fedtsyren i , udtrykt som FAME

F_{IS} er korrektionsfaktoren for den interne standard

m er massen af prøven, i mg

m_{IS} er massen af den interne standard, i mg.

Resultaterne angives med to decimaler.

▼ M28

6. PRØVERAPPORT

Prøverapporten skal indeholde en beskrivelse af de metoder, der er anvendt til fremstilling af methylesterne og til gaskromatograferingen. Den skal også indeholde alle de enkeltheder, der ikke er nævnt i denne standardmetode, eller som betragtes om valgfri, samt en redegørelse for eventuelle forhold, der kan have haft indflydelse på resultaterne.

Prøverapporten skal indeholde alle nødvendige oplysninger til fuldstændig identifikation af prøven.

7. NØJAGTIGHED

7.1. **Resultater af den sammenlignende laboratorieprøvning**

Nærmere oplysninger om en sammenlignende laboratorieprøvning, for så vidt angår metodens præcision, findes i bilag C til standarden IOC/T.20/Doc. No 33. De værdier, der er fremkommet ved denne sammenlignende laboratorieprøvning, gælder ikke nødvendigvis for andre koncentrationsintervaller og matrixer end de angivne.

7.2. **Repeterbarhed**

Den absolutte forskel mellem to uafhængige enkeltresultater, der er opnået med den samme metode på identisk testmateriale på det samme laboratorium af den samme person med det samme udstyr inden for et kort tidsinterval, vil i højst 5 % af tilfældene være større end r angivet i tabel 1-14 i bilag C til standard IOC/T.20/Doc. No 33.

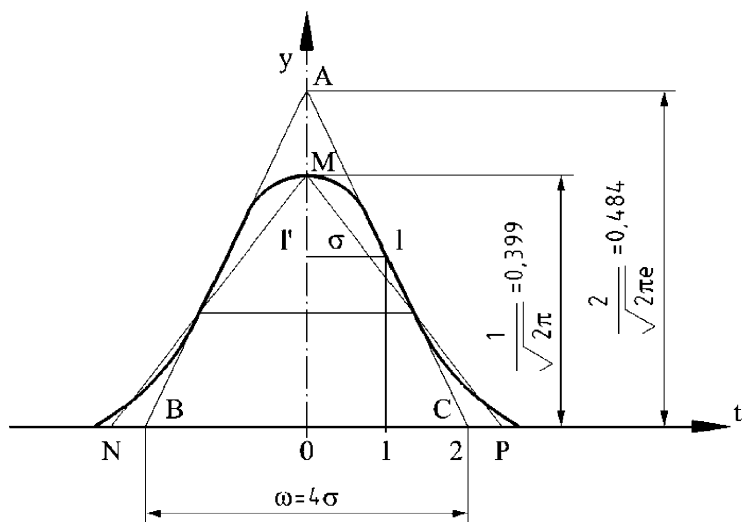
7.3. **Reproducerbarhed**

Den absolutte forskel mellem to enkeltresultater, der er opnået med den samme metode på identisk testmateriale på forskellige laboratorier udført med forskelligt udstyr, vil i højst 5 % af tilfældene være større end R angivet i tabel 1-14 i bilag C til standard IOC/T.20/Doc. No 33.

▼ M28

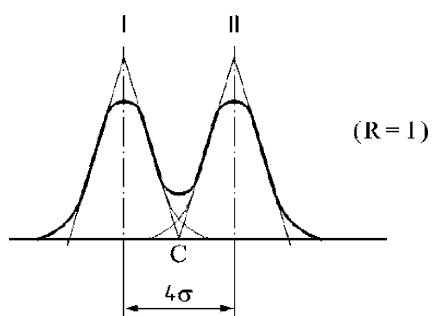
Tillæg A

Figur 1

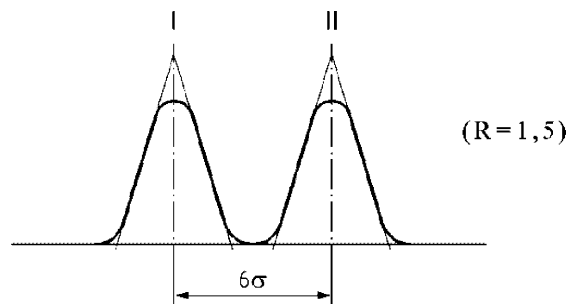


med bredden $\omega_{0,5}$ i den halve højde af trekanten (ABC) og b bredde i den halve højde af trekanten (NPM).

Figur 2



Figur 3

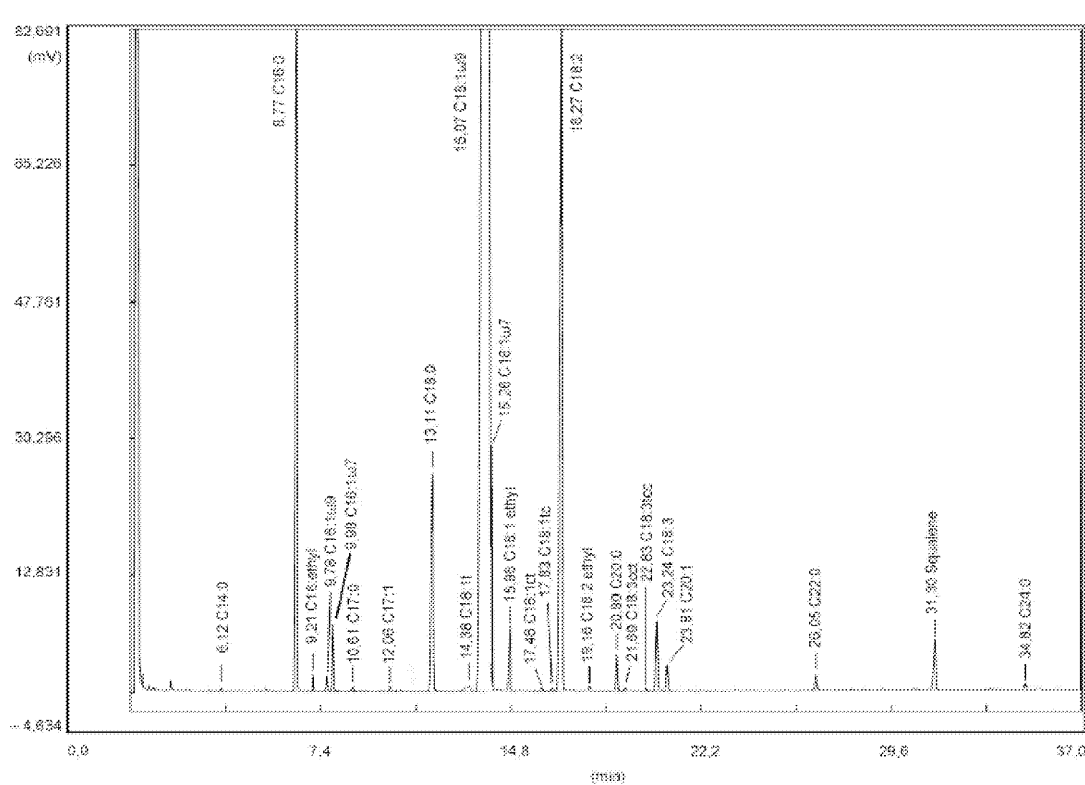


▼ **M28**

Tillæg B

Figur 1

Gaskromatografisk profil af olie af olivenpresserester, fremkommet ved metoden med kold methylering



Toppene er for methyl- og ethylestrene, hvor intet andet er anført.

▼B*BILAG XI***BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF FLYGTIGE HALOGENE
OPLØSNINGSMIDLER I OLIVENOLIE****1. PRINCIP**

Analyse ved gaskromatografi ifølge teknikken med luftrummet over væsken (head space).

2. APPARATUR

2.1. Gaskromatografiapparat udstyret med en elektronindfangningsdetektor (ECD).

2.2. Apparat for luftrummet over væsken (head space).

2.3. Gaskromatografisøjle af glas med længde på 2 m og med 2 mm diameter, stationær fase

10 % OV101 på chromosorb WLA

DMOS granulometri 80—100 Mesh.

2.4. Transportluftart og hjælpluftart: nitrogen.

2.5. 10 til 15 ml glaskolber med en foring af teflon og en aluminiumsprop med en åbning til udtagning med sprøjte.

2.6. Tang til hermetisk lukning.

2.7. Sprøjte til luftarter på 0,5 til 2 ml.

3. REAGENSER

Flygtige halogene opløsningsmidler med en renhedsgrad, der egner sig til gaskromatografi.

Pentan med en renhedsgrad, der egner sig til gaskromatografi.

4. ANALYSEMETODE

4.1. Der afvejes med nøjagtighed ca. 3 g olie i en glaskolbe (der ikke må genbruges), og kolben tilproppes indtil den hermetiske lukning. Kolben anbringes i en termostat ved 70° C i en time. Der udtages med akkuratse ved hjælp af sprøjten en mængde på 0,2 til 0,5 ml af luftrummet over væsken. Det indsprøjtes i gaskromatografisøjleapparatet, der er indstillet således:

— injektortemperatur: 150° C

— søjletemperatur: 70 til 80° C

— detektortemperatur: 200 til 250° C.

Andre temperaturer kan også anvendes, såfremt resultaterne er ækvivalente.

4.2. Referenceopløsninger. Der tilberedes standardopløsninger ved brug af raffineret olivenolie uden spor af opløsningsmidler til variable koncentrationer af flygtige halogene opløsningsmidler mellem 0,05 og 1 ppm og i forhold til det formodede indhold af prøven. En eventuel fortynding af flygtige halogene opløsningsmidler skal ske ved hjælp af pentan.

4.3. Mængdemæssig vurdering. Forholdet fastlægges mellem overfladerne eller toppene på prøverne og den standardopløsning, der har den nærmeste formodede koncentration. Hvis den forholdsvise forskel er over 10 %, er det nødvendigt at gentage analysen ved sammenligning med en ny standardopløsning, indtil dens koncentration overholder ovennævnte forholdsvise forskel. Indholdet af flygtige halogene opløsningsmidler bestemmes på grundlag af et gennemsnit af elementære indsprøjtninger.

4.4. Udtryk for resultaterne. Resultaterne udtrykkes i ppm (mg/kg). Metodens påvisningsgrænse er 0,01 mg/kg.

▼ **M26**

BILAG XII

DET INTERNATIONALE OLIVENRÅDS METODE TIL ORGANOLEPTISK VURDERING AF JOMFRUOLIER▼ **M28**

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Formålet med den internationale metode, der er beskrevet i dette bilag, er at fastlægge proceduren for vurdering af jomfruoliers organoleptiske kendetegn, jf. punkt 1 i del VIII i bilag VII til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EU) nr. 1308/2013 ⁽¹⁾, og at fastlægge metoden til klassifikation af jomfruolie på grundlag af sådanne kendetegn. Metoden omfatter også angivelser til frivillig mærkning.

Den beskrevne metode gælder kun for jomfruolier og for klassifikation og mærkning af sådanne olier i forhold til de opfattede manglers intensitet og den frugtagtige karakter, der bestemmes af en gruppe udvalgte og optrænede smagere, der er nedsat som et panel.

De IOC-standarder, der er nævnt i dette bilag, anvendes i den seneste tilgængelige version.

▼ **M26**

2. ALMINDELIG GRUNDORDLISTE FOR SENSORISK ANALYSE

Der henvises til standarden IOC/T.20/Doc. No 4 "Sensory Analysis: General Basic Vocabulary".

3. SÆRLIG ORDLISTE

3.1. *Negative egenskaber*

Mudret/bundfald Karakteristisk flavour ved olie, som er udvundet af oliven, der har været opbevaret i bunker eller oplagret på vilkår, som har medført et fremskredet stadium af anaerob forgæring, eller ved olie, der har været i kontakt med dekanteret bundfald, og som også har gennemgået en anaerob forgæring i bunker eller tanke.

Mug-fugt-jord Karakteristisk flavour ved olie, som er udvundet af oliven, hvori svampe og gær har udviklet sig, fordi de har været opbevaret i flere dage i fugtige omgivelser, eller ved olie, som er udvundet af oliven, som er opsamlet med jord eller mudder på overfladen, og som ikke er blevet vasket.

Vinagtig-eddikeagtig/sur-syrlig Karakteristisk flavour ved visse olier, som minder om vin eller eddike. Den skyldes hovedsagelig en aerob forgæring af oliven eller rester af olivenpasta i pressemåtter, der ikke er blevet korrekt afvasket, så der dannes eddikesyre, ethylacetat og ethanol.

Harsk Flavour ved olie, der har undergået en intens oxideringsproces.

Frostbidte oliven (vådt træ) Karakteristisk flavour ved olie, som er udvundet af oliven, der er skadet af frost på træet.

⁽¹⁾ Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EU) nr. 1308/2013 af 17. december 2013 om en fælles markedsordning for landbrugsprodukter og om ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 922/72, (EØF) nr. 234/79, (EF) nr. 1037/2001 og (EF) nr. 1234/2007 (EUT L 347 af 20.12.2013, s. 671).

▼ **M28**3.1.1. *Andre negative egenskaber*

<i>Ophedet brændt</i>	<i>eller</i>	Karakteristisk flavour ved olie forårsaget af overdreven og/eller langvarig opvarmning under bearbejdningen, især når pastaen blandes termisk, hvis det gøres under uegnede termiske forhold.
<i>Hø</i>		Karakteristisk flavour ved visse olier, som er udvundet af udtørrede oliven.
<i>Grov</i>		Tyk, pastaagtig fornemmelse i munden, som frembringes af visse gamle olier.
<i>Fedt</i>		Flavour ved olie, der minder om dieselolie, fedt eller mineralsk olie.
<i>Grøntsags-vand</i>		Flavour, som olien får som følge af langvarig kontakt med forgæret grøntsagsvand.
<i>Saltlage</i>		Flavour ved olie, der er udvundet af oliven, som har været konserveret i saltlage.
<i>Metallisk</i>		Metallisk flavour, der minder om metal. Den er karakteristisk for olie, der har været i langvarig kontakt med metaloverflader under knusning, blanding, presning eller opbevaring.
<i>Esparto</i>		Karakteristisk flavour ved olie, der er udvundet af oliven, som er presset i nye måtter af espartogræs. Lugten/smagen kan variere, alt efter om måtterne er lavet af grønt eller tørret espartogræs.
<i>Larvebefængt</i>		Flavour ved olie, der er udvundet af oliven, som har været hårdt angrebet af larver af olivenfluen (<i>Bactrocera oleae</i>).
<i>Agurk</i>		Flavour, der fremkommer, når en olie har været pakket hermetisk i for lang tid, især i blikbeholdere, og som tilskrives dannelsen af 2,6-nonadienal.

3.2. **Positive egenskaber**

<i>Frugtagtig</i>	En række olfaktoriske fornemmelser, der afhænger af olivensorten, og som kendetegner olie, som er udvundet af sunde og friske, grønne eller modne frugter. De opfattes direkte og/eller via den bageste del af næsen.
<i>Bitter</i>	Karakteristisk smag af olie, der er udvundet af grønne oliven eller oliven, der er lige ved at skifte farve. Den opfattes af de bægerformede papiller, der danner tunge-V'et.
<i>Skarp</i>	En prikkende fornemmelse, der er karakteristisk for olier, som er udvundet i produktionsårets begyndelse, især af endnu umodne oliven. Den kan opfattes i hele mundhulen og navnlig i svælget.

▼ **M29**3.3. **Frivillig anvendelse af ord og udtryk på etiketter**

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

▼ **M29**

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

- *intens*, hvis medianen for den pågældende egenskab er på over 6
- *middel*, hvis medianen for den pågældende egenskab er på mellem 3 og 6
- *let*, hvis medianen for den pågældende egenskab er på under 3.

Frugtagtig En række olfaktoriske fornemmelser, der afhænger af olivensorten, og som kendetegner olie, som er udvundet af sunde og friske frugter, i hvilken hverken grøn eller moden frugt er fremherskende. De opfattes direkte og/eller via den bageste del af næsen.

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

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

Afbalanceret Olie, der ikke er uafbalanceret. Ved uafbalanceret forstås den lugt-, smags- og berøringsfølelse, hvor medianen for egenskaben bitter og medianen for egenskaben skarp ikke er mere end to point større end medianen for egenskaben frugtagtig.

Mild olie Olie, hvor medianen for egenskaben bitter og medianen for egenskaben skarp er lig med eller mindre end 2.

Liste over udtryk, der benyttes i forhold til intensiteten af opfattelsen:

Udtryk til brug ved udformning af et organoleptisk testbevis	Median for egenskaben:
Frugtagtig	—
Moden frugt	—
Umoden frugt	—
Let frugtagtig	Under 3
Middel frugtagtig	Mellem 3 og 6
Intensivt frugtagtig	Over 6
Let moden frugt	Under 3

▼ **M29**

Udtryk til brug ved udformning af et organoleptisk testbevis	Median for egenskaben:
Middel moden frugt	Mellem 3 og 6
Intensiv moden frugt	Over 6
Let umoden frugt	Under 3
Middel umoden frugt	Mellem 3 og 6
Intensiv umoden frugt	Over 6
Let bitterhed	Under 3
Middel bitterhed	Mellem 3 og 6
Intensiv bitterhed	Over 6
Let skarphed	Under 3
Middel skarphed	Mellem 3 og 6
Intensiv skarphed	Over 6
Afbalanceret olie	Medianen for egenskaben bitter og medianen for egenskaben skarp er ikke over 2 point over medianen for frugtagtighed
Mild olie	Medianen for egenskaben bitter og medianen for egenskaben skarp er ikke over 2

▼ **M26**

4. GLAS TIL OLIESMAGNING
Der henvises til standarden IOC/T.20/Doc. No 5, "Glass for Oil Tasting".
5. TESTLOKALE
Der henvises til standarden IOC/T.20/Doc. No 6, "Guide for the Installation of a Test Room".
6. APPARATUR
Følgende apparatur, som er nødvendigt, for at smageren kan udføre sin opgave rigtigt, skal anbringes i hver bås og skal være inden for nem rækkevidde:
 - glas (standardiserede), der indeholder prøverne, og som er nummererede, tildækket med urglas og opbevares ved $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$
 - profilskema (se figur 1) i papirform eller elektronisk, såfremt kravene til profilskemaet er opfyldt, og brugsanvisning, hvis det er nødvendigt
 - kuglepen eller uudslettelig stempelfarve
 - bakker med skiver af æble og/eller vand/mineralvand og/eller tvebakker
 - et glas vand ved omgivelsestemperatur
 - oversigt over de generelle regler anført i afsnit 8.4 og 9.1.1
 - spytbakker.

▼ M26

7. PANELLEDER OG SMAGERE

7.1. **Panelleder**

Panellederen skal være en tilstrækkelig trænet, kyndig person, som er ekspert i de typer olie, han vil støde på under sit arbejde. Han er nøglefiguren i panelet og er ansvarlig for dets organisation og virke.

Panellederens opgave kræver grundlæggende uddannelse i værktøjerne til sensorisk analyse, sensorisk færdighed, omhu ved forberedelsen og tilrettelæggelsen af test samt den dygtighed og tålmodighed, der kræves for at planlægge og udføre test på en videnskabelig måde.

Panellederen er ansvarlig for at træne, udvælge og overvåge smagerne for at konstatere, om de lever op til et passende niveau med hensyn til dygtighed. Han er således ansvarlig for smagerens vurderinger, som altid skal være objektive, og for hvilke han skal udforme specifikke fremgangsmåder baseret på test og forsvarlige kriterier for godkendelse og afvisning. Se standarden IOC/T.20/Doc. No 14, "Guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil tasters".

Panellederen er ansvarlig for panelets arbejde og dermed for dets evaluering, som skal dokumenteres pålideligt og objektivt. Han skal til enhver tid kunne dokumentere, at metoden og smagerne er underlagt kontrol. Regelmæssig kalibrering af panelet anbefales (IOC/T.20/Doc. No 14, § 5).

Panellederen er eneansvarlig for panelets optegnelser, som altid skal kunne spores. Han skal overholde de sikrings- og kvalitetskrav, der er fastlagt i internationale standarder for sensorisk analyse, og til enhver tid sikre prøvernes anonymitet.

Han er ansvarlig for at føre en fortegnelse over apparaturet og for at sikre, at det apparatur og udstyr, der er nødvendigt for at overholde denne metodes specifikationer, er tilstrækkeligt rengjort og vedligeholdt, og han skal registrere dette og overensstemmelse med testbetingelserne skriftligt.

Han er ansvarlig for at modtage og opbevare prøver efter deres ankomst til laboratoriet og for at opbevare dem efter testen. I den forbindelse skal han til enhver tid sikre, at prøverne forbliver anonyme og opbevares korrekt. Til det formål skal han udforme skriftlige procedurer, som sikrer, at hele processen kan spores og frembyder de nødvendige garantier.

Panellederen er endvidere ansvarlig for at tilberede og kode prøverne og for at præsentere dem for smagerne i overensstemmelse med en forsøgsplan, der overholder på forhånd fastlagte protokoller, og for at indsamle de opnåede data fra smagerne.

Han skal udvikle og udforme andre fremgangsmåder, der måtte være nødvendige for at supplere denne standard og sikre, at panelet fungerer effektivt.

Han skal finde metoder til at sammenligne panelets resultater med resultaterne fra andre paneler, der analyserer jomfruolie, med henblik på at sikre, at panelet udfører sin opgave korrekt.

▼ M26

Det er panellederens opgave at stimulere paneldeltagernes moral ved at anspore deres interesse, nysgerrighed og konkurrenceånd. Til det formål anbefales det på det kraftigste, at vedkommende etablerer tovejskommunikation med paneldeltagerne, så de informeres om alle de opgaver, de udfører, og de opnåede resultater. Han skal sikre, at hans egen mening ikke er kendt, og han skal forhindre mulige ledertyper i at hævde deres kriterier over for de øvrige smagere.

Han skal sammenkalde smagerne i tilstrækkelig god tid og skal opklare alle tvivlsspørgsmål, smagerne kan have med hensyn til udførelsen af test, men han skal afstå fra at påvirke deres mening om prøverne.

▼ M287.1.1. *Stedfortrædende panelleder*

I velbegrundede tilfælde kan en stedfortrædende panelleder træde i panellederens sted og udføre pligter vedrørende udførelsen af forsøgene. Stedfortræderen skal have alle de nødvendigheder færdigheder, som kræves af en panelleder. 0171

7.2. **Smagere**

De personer, der virker som smagere ved organoleptiske bedømmelser af olivenolie, gør det frivilligt. Kandidater bør derfor indgive en skriftlig ansøgning. Kandidater udvælges, trænes og overvåges af panellederen i overensstemmelse med deres evne til at skelne mellem prøver, der ligner hinanden. Man bør erindre, at deres evne til at skelne nøjagtigt vil forbedres ved træning.

Smagerne skal handle som reelle sensoriske observatører, som tilsidesætter deres personlige smag og alene rapporterer de fornemmelser, de opfatter. For at gøre det skal de altid arbejde i tavshed og på en afslappet og uforceret måde, idet de så vidt muligt retter deres sensoriske opmærksomhed mod den prøve, de bedømmer.

Der kræves mellem 8 og 12 smagere til hver test. Det er dog klogt at holde nogle ekstra smagere i reserve, så de kan træde til i tilfælde af fravær.

▼ M26

8. TESTBETINGELSER

8.1. **Præsentation af prøven**

Den olieprøve, der skal analyseres, præsenteres i standardiserede glas til smagning, som overholder standarden IOC/T.20/Doc. No 5 »Glass for oil tasting«.

Glasset skal indeholde 14-16 ml olie eller mellem 12,8 og 14,6 g, hvis prøverne skal vejes, og skal være dækket med et urglas.

Hvert glas skal være mærket med en kode bestående af tal eller en kombination af bogstaver og tal, der vælges vilkårligt. Koden anføres ved hjælp af en lugtfri metode.

8.2. **Test- og prøvetemperatur**

De olieprøver, der skal undersøges, skal opbevares i glas ved 28 ° C ± 2 °C under hele testen. Denne temperatur er valgt, fordi det er nemmere at observere organoleptiske forskelle end ved omgivelsestemperatur, og fordi de aromatiske forbindelser, der er særegne for disse olier, kun fordamper svagt ved lavere temperaturer, mens der ved højere temperaturer dannes flygtige forbindelser, som er særegne for opvarmede olier. Se standarden IOC/T.20/Doc. No 5 "Glass for Oil Tasting" for oplysninger om den metode, der er anvendt til at opvarme prøver i glasset.

▼ M26

I testlokalet skal temperaturen være mellem 20 °C og 25 °C (se IOC/T.20/Doc. No 6).

8.3. Tider for smagningens afholdelse

Morgenen er det bedste tidspunkt for smagning af olie. Det er bevist, at der i dagens løb forekommer optimale perceptionsperioder med hensyn til lugt og smag. Forud for måltiderne går der en periode, hvor følsomheden for lugt og smagsindtryk er forøget, hvorimod følsomheden aftager efter måltidet.

Dette hensyn bør dog ikke føre til overdrivelser, hvor sult kan distrahere smagerne og dermed nedsætte deres evne til at skelne. Det anbefales derfor, at smagningen afholdes mellem kl. 10.00 og 12.00.

8.4. Smagere: generelle adfærdsregler

Disse anbefalinger gælder kandidaternes og smageres adfærd under arbejdet.

Når smagere indkaldes af panellederen for at deltage i en organoleptisk test, bør de være i stand til at møde på den fastsatte tid, og de skal overholde følgende regler:

- De skal undlade at ryge eller drikke kaffe i mindst 30 minutter før det tidspunkt, der er fastsat for smagningen.
- De må ikke bruge nogen form for parfume, kosmetik eller sæbe, hvis duft ville kunne holde sig til tidspunktet for smagningen. De skal vaske hænderne med uparfumeret sæbe, og de skal derefter skylle og tørre hænderne så ofte, som det er nødvendigt for at fjerne en eventuel duft.
- De skal faste i mindst en time, før smagningen udføres.
- Hvis en smager føler sig fysisk utilpas, og især hvis hans smags- eller lugtesans er påvirket, eller hvis han er under en psykologisk påvirkning, der forhindrer ham i at koncentrere sig om sin opgave, skal han trække sig ud af smagningen og underrette panellederen herom.
- Når smagerne har opfyldt ovenstående krav, skal de tage plads i den bås, der er tildelt hver enkelt smager, på en rolig og ordentlig måde.
- Smagerne skal omhyggeligt læse de instruktioner, der er givet på profilskemaet, og de må ikke begynde at undersøge prøven, før de er helt parate til at udføre opgaven (afslappet og uforceret). Hvis der opstår nogen som helst tvivl, skal den enkelte smager drøfte det med panellederen i enenum.
- De skal forholde sig tavse under smagningen.
- Deres mobiltelefoner skal altid holdes slukket under smagningen, så de ikke påvirker de øvrige smageres koncentration og forstyrrer deres arbejde.

9. FREMGANGSMÅDE VED ORGANOLEPTISK BEDØMMELSE OG KLASSIFICERING AF JOMFRUOLIE**9.1. Teknik ved smagning****▼ M29**

- 9.1.1. Smageren skal tage glasset op, og idet han holder det dækket med urglasset, skal han holde det lidt skråt. Han skal så dreje glasset helt rundt i denne stilling, så en så stor del af indersiden som muligt bliver fugtet. Når dette stadium er overstået, skal han fjerne urglasset og lugte til prøven, idet han tager jævne, langsomme, dybe indåndinger for at bedømme olien. Lugtefasen må ikke overstige 30 sekunder. Hvis han ikke er kommet til en konklusion inden for dette tidsrum, skal han tage en kort pause, inden han prøver igen.

▼ **M29**

Når den olfaktoriske test er udført, skal smageren bedømme de fornemmelser, der fremkaldes i munden (generelle retronasale lugte-, smags- og føleindtryk). For at gøre dette skal han tage en lille tår af olien (ca. 3 ml). Det er meget vigtigt, at olien fordeles ud over hele mundhulen, fra den forreste del af munden og tungen langs siderne til den bageste del af tungen og halsen, da det er velkendt, at opfattelsen af smags- og føleindtryk varierer i intensitet over de forskellige områder af tungen, ganen og halsen.

Det bør understreges, at det er afgørende, at en tilstrækkelig mængde olie spredes meget langsomt over den bageste del af tungen og ned mod halsen, mens smageren koncentrerer sig om den rækkefølge, i hvilken de bitre og skarpe stimuli fremkommer. Hvis dette ikke sker, kan begge disse stimuli undgå smagerens opmærksomhed ved visse olier, eller den bitre stimulus kan blive tilsløret af den skarpe stimulus.

Ved at tage korte åndedrag lige efter hinanden, idet luften trækkes ind gennem munden, kan smageren ikke blot sprede prøven ud over hele mundhulen, men også opfatte de flygtige aromatiske komponenter via den bageste del af næsen, fordi brugen af denne kanal fremtvinges.

Bemærkning: Hvis smagerne ikke opfatter frugtagtighed i en prøve, og intensiteten af den bestemmende negative egenskab er 3,5 eller derunder, kan panellederen beslutte, at smagerne skal gennemføre analysen af prøven på ny ved omgivende temperatur (COI/T.20/Doc. No 6/Rev. 1, september 2007, afsnit 3 — General specifications for installation of a test room). Panellederen skal i så fald fastlægge sammenhængen og begrebet omgivende temperatur. Når prøven når stuetemperatur, foretager smagerne en ny vurdering, som udelukkende gennemføres med henblik på at fastslå, om de opfatter frugtagtighed. Er dette tilfældet, noterer de intensiteten på skalaen.

Følesansen bør også tages i betragtning, og derfor bør smageren indtage olien.

▼ **M26**

- 9.1.2. Når der foretages organoleptisk vurdering af en jomfruolie, bør der højst vurderes FIRE PRØVER i hver session, og der bør højst gennemføres tre sessioner om dagen for at undgå den kontrastvirkning, der kan opstå, hvis prøver smages umiddelbart efter hinanden.

Da flere på hinanden følgende smagninger fremkalder træthed eller nedsat følsomhed, er det vigtigt at bruge et produkt, der kan fjerne resterne af olie fra den forudgående smagning fra munden.

Det anbefales at bruge et lille stykke æble, som, efter at man har tygget det, kan spyttes ud i spytbakken. Derefter skylles munden med lidt vand ved omgivelsestemperatur. Der skal gå mindst 15 minutter mellem afslutningen af én session og påbegyndelsen af den næste.

9.2. Smagerens anvendelse af profilskemaet

Det profilskema, som smagerne skal benytte, er anført i figur 1 i dette bilag.

Hver smager i panelet skal lugte til og derefter smage ⁽¹⁾ på den olie, der bedømmes. Han skal derefter angive den intensitet, hvormed han opfatter hver enkelt negative og positive egenskab, på den 10 cm-skala, der er anført på det udleverede profilskema.

⁽¹⁾ En smager kan undlade at smage på olien, hvis han konstaterer særligt intense negative egenskaber ad direkte olfaktorisk vej. I det tilfælde noteres denne ekstraordinære omstændighed i profilskemaet.

▼ M26

Hvis smageren opfatter negative egenskaber, som ikke er anført i afsnit 4, skal han anføre dem i rubrikken "Andet" med det eller de udtryk, som beskriver dem med den størst mulige præcision.

▼ M28**9.3. Panellederens anvendelse af data**

Panellederen indsamler de profilskemaer, som smagerne har udfyldt, og gennemgår de intensiteter, der er tildelt de forskellige egenskaber. Hvis han konstaterer en anormalitet, skal han anmode smageren om at kontrollere sit profilskema og om nødvendigt gentage forsøget.

Panellederen indtaster hvert panelmedlems vurderingsdata i et computerprogram, som f.eks. det program, der foreslås i standarden IOC/T.20/Doc. No 15, med henblik på at foretage en statistisk beregning af analyseresultaterne med udgangspunkt i beregningen af deres median. Se dette bilags afsnit 9.4 og tillæg. Data for en prøve registreres i en matrix bestående af ni kolonner, der svarer til de ni sanseegenskaber, og antal linjer svarende til antal smagere i panelet.

Når en mangel er opfattet og anført i rubrikken »Andet« af mindst 50 % af panelet, skal panellederen beregne medianen for denne mangel og den tilsvarende klassifikation.

VÆRDIEN af den robuste variationskoefficient, som definerer klassifikationen (mangel med den stærkeste egenskab for intensitet og frugtagtighed) må ikke overstige 20 %.

Hvis den gør det, skal panellederen gentage bedømmelsen af den specifikke prøve i en anden smagningssession.

Hvis denne situation ofte opstår, bør panellederen sørge for yderligere oplæring af smagerne (IOC/T.20/Doc. No 14, § 5) og bruge repeterbarhedsindekset og afvigelsesindekset til at kontrollere smagernes arbejde (IOC/T.20/Doc. 14, § 6).

▼ M29**9.4. Klassifikation af olien**

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

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

- a) Ekstra jomfruolie: Medianen for mangler er lig med 0, og medianen for egenskaben frugtagtig er større end 0.
- b) Jomfruolie: Medianen for mangler er større end 0 og lig med eller mindre end 3,5, og medianen for egenskaben frugtagtig er større end 0.
- c) Bomolie: Medianen for mangler er større end 3,5, eller medianen for mangler er mindre end eller lig med 3,5, og medianen for egenskaben frugtagtig er lig med 0.

▼ **M29**

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

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

9.5. Kriterier for godkendelse og afvisning af dobbelte analyser

Den normaliserede fejl, der er defineret nedenfor, anvendes til at bestemme, hvorvidt de to resultater af en dobbelt analyse er homogene og statistiske acceptable:

$$E_n = \frac{|Me_1 - Me_2|}{\sqrt[2]{U_1^2 + U_2^2}}$$

hvor Me_1 og Me_2 er medianerne for den dobbelte analyse (dvs. første og anden analyse), og U_1 og U_2 er de ekspanderede usikkerheder for de to værdier, som beregnes i henhold til tillæg I som følger:

$$U_1 = c \times s^* \text{ hvor } s^* = \frac{(CV_r \times Me_1)}{100}$$

For den ekspanderede usikkerhed gælder, at $c = 1,96$; således at:

$$U_1 = 0,0196 \times CV_r \times Me_1$$

hvor CV_r er den robuste variationskoefficient.

E_n skal være 1,0 eller derunder, hvis de to opnåede værdier skal anses for ikke at være statistisk forskellige.

▼ **M26***Tillæg***Metode til beregning af median og konfidensintervaller****Median**

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

Medianen er det reelle tal X_m , der er kendetegnet ved, at sandsynligheden (p) for, at værdierne af fordelingen (X) er mindre end dette tal (X_m), er mindre end eller lig med 0,5, og at sandsynligheden (p) for, at værdierne af fordelingen (X) er mindre end eller lig med X_m , samtidig er større end eller lig med 0,5. Ifølge en mere praktisk definition er medianen den 50. percentil af en fordeling, hvis elementer er ordnet i stigende rækkefølge. Med andre ord er medianen den midterste værdi i en ordnet række af et ulige antal elementer eller gennemsnittet af de to midterste værdier i en ordnet række af et lige antal elementer.

Robust standardafvigelse

Som et pålideligt estimat af variabiliteten omkring medianen benyttes Stuart og Kendalls estimat over den robuste standardafvigelse (4). I følgende formel er N antallet af observationer, og IQR er den interkvartile afstand, dvs. det robuste estimat af variabiliteten af de pågældende data (den interkvartile afstand dækker nøjagtig 50 % af elementerne i en given sandsynlighedsfordeling):

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

Den interkvartile afstand beregnes som afstanden mellem den 75. og den 25. percentil.

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

Percentilen er værdien X_{pc} , der er kendetegnet ved, at sandsynligheden (p) for, at værdierne af fordelingen er mindre end X_{pc} , er mindre end eller lig med en given procentdel, og at sandsynligheden (p) for, at værdierne af fordelingen er mindre end eller lig med X_{pc} , samtidig er større end eller lig med den pågældende procentdel. Procentdelen angiver den pågældende fordelingsfraktion. For medianens vedkommende er den 50 %.

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

Percentilen er i praksis den værdi af fordelingen, der svarer til et bestemt areal, som tegnes ud fra fordelings- eller tæthedskurven. Den 25. percentil er f.eks. den værdi af fordelingen, som svarer til et areal på 0,25 eller 25/100.

Ved denne metode beregnes percentiler på grundlag af de reelle tal, der vises i datamatrixen (fremgangsmåde ved beregning af percentiler).

Robust variationskoefficient (%)

Variationskoefficienten $CV_r\%$ er et rent tal, der angiver den procentvise variabilitet i den analyserede talrække. Af denne grund er variationskoefficienten til stor nytte som kontrol af paneldeltagernes pålidelighed.

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

▼ M26**95 %-konfidensintervaller**

95 %-konfidensintervallerne (C.I.) (fejlfrekvens af første orden lig med 0,05 eller 5 %) repræsenterer det interval, inden for hvilket værdien af medianen ville variere, hvis det var muligt at gentage et forsøg et uendeligt antal gange. I praksis angiver dette interval variabilitetsintervallet for forsøget ved de herskende betingelser, idet det antages, at forsøget kan gentages flere gange. Intervallet er ligesom *variationskoefficienten* en hjælp til evaluering af forsøgets pålidelighed.

$$C.I._{upper} = Me + (c \times s^*)$$

$$C.I._{lower} = Me - (c \times s^*)$$

hvor $C = 1,96$, hvis konfidensintervallet er på 95%.

Et eksempel på beregningsskemaet findes i bilag I til standarden IOC/T 20/Doc. No 15.

Referencer

- 1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL.SYSTAT Inc.
- 2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica. Maggioli Editore, Rimini.
- 3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook. Elsevier. Amsterdam.
- 4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1. Hafner Publishing Co.
- 5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots. The American Statistician, 32, (2), 12-16.
- 6) IOC/T.28/Doc. No 1 September 2007, Guidelines for the accreditation of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil according to standard ISO/IEC 17025:2005.
- 7) IOC/T.20/Doc. No 14.
- 8) IOC/T.20/Doc. No 15.
- 9) ISO/IEC 17025:05.

▼ M20

▼ M19

▼B*BILAG XV*

1. OLIEINDHOLD I PRESSERESTER AF OLIVEN

1.1. **Apparatur**

- Eget ekstraktionsapparat, forsynet med en 200—250 ml kolbe.
- Elektrisk opvarmet bad (sandbad, vandbad, osv.) eller varmeplade.
- Analysevægt.
- Ovn, der er indstillet til højst 80 °C.
- Elektrisk ovn med temperaturregulering, der kan indstilles til 103 °C ± 2 °C, og som muliggør luftindblæsning eller vakuum.
- Mekanisk mølle, der er let at rengøre, egnet til olivenoliekager, og som er i stand til at male uden opvarmning eller mærkbar reduktion af indholdet af vand, af flygtige stoffer og af stoffer, der kan uddrages ved hjælp af hexan.
- Ekstraktionshylster og vat eller filterpapir, fri for substanser, der kan uddrages ved hjælp af hexan.
- Ekssikator.
- Sigte med huller på 1 mm i diameter.
- Pimpsten i små korn, tørret.

1.2. **Reagens**

Teknisk n-hexan, hvis fordampningsrest ved fuldstændig fordampning er mindre end 0,002 g/100 ml.

2. FREMGANGSMÅDE

2.1. **Tilberedning af prøven**

Om nødvendigt males analyseprøven i den mekaniske mølle, der skal være omhyggeligt rengjort på forhånd, således at prøven kan reduceres til små partikler, der kan passere sien fuldstændigt.

Ca. en tyvendel af prøven anvendes til en fuldstændig rengøring af møllen; denne formalede del bortkastes, og resten males, opsamles og blandes med omhu, hvorefter analysen straks foretages.

2.2. **Prøvemængde**

Der afvejes med 0,01 g nøjagtighed ca. 10 g af analyseprøven til prøvemængde, når formalingen er afsluttet.

2.3. **Tilberedning af ekstraktionshylstret**

Prøvemængden anbringes i hylstret, og dette lukkes med vandsugende vat. Såfremt der anvendes filterpapir, indpakkes prøven i dette papir.

2.4. **Fortørring**

Hvis presseresterne er meget fugtige (indhold af vand og flygtige stoffer på over 10 %), foretages der en fortørring, idet det fyldte hylster (eller filterpapir) anbringes en passende tid i ovnen, der højst kan opvarmes til 80 °C, således at indholdet af vand og flygtige stoffer bringes ned under 10 %.

▼ B**2.5. Tilberedning af kolben**

Kolben, der indeholder 1 à 2 pimpstenskorn, og som på forhånd er tørret i ovnen ved en temperatur på $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ og derefter afkølet mindst 1 time i eksikkatoren, vejes med 1 mg nøjagtighed.

2.6. Første ekstraktion

Hylstret (eller filterpapiret), der indeholder prøvemængden, anbringes i ekstraktionsapparatet. Den nødvendige mængde hexan hældes i kolben. Kolben tilsluttes ekstraktionsapparatet, og det hele anbringes i det elektrisk opvarmede bad. Opvarmningen reguleres således, at tilbageløbsmængden udgør mindst tre dråber i sekundet (moderat, ikke stærk kogning).

Efter fire timers ekstraktion foretages afkøling. Hylstret udtages af ekstraktionsapparatet og anbringes i en luftstrøm for at fjerne størstedelen af det indeholdte opløsningsmiddel.

2.7. Anden ekstraktion

Hylstret tømmes i mikromøllen, og der males så fint som muligt.

Anbring mængdemæssigt blandingen påny i hylstret og dette i ekstraktionsapparatet.

Ekstraktionen begynder påny, og den fortsættes endnu to timer, idet kolben med forrige ekstraktion anvendes.

Den opløsning, der opnås i ekstraktionskolben, skal være gennemsigtig. Såfremt dette ikke er tilfældet, filtreres der på et stykke filterpapir, idet den første kolbe og filterpapiret gentagne gange vaskes med hexan. Filtratet og afvaskningsopløsningen opsamles i en særskilt kolbe, der på forhånd er tørret og vejtes med 1 mg nøjagtighed.

2.8. Eliminering af opløsning og vejning af ekstraktet

Størstedelen af opløsningsmidlet fjernes ved destillation i elektrisk opvarmet vandbad. De sidste rester af opløsningsmidlet fjernes ved at opvarme kolben i ovnen ved $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ i 20 minutter. Fordampningen fremskyndes enten ved indblæsning af luft eller, bedre, inaktiv gas fra tid til anden eller ved anvendelse af vakuum.

Kolben afkøles i eksikkatoren i mindst 1 time, og den vejes med 1 mg nøjagtighed.

Der opvarmes på ny i 10 min. under samme forhold, hvorefter kolben afkøles i eksikkator og vejes.

Forskellen mellem to vejninger må ikke overstige 10 mg. I modsat fald opvarmes der på ny i perioder på ti minutter med efterfølgende afkøling og vejning, indtil forskellen i masse er højst 10 mg. Den sidste vejning af kolben noteres.

Der foretages to bestemmelser.

3. UDFORMNING AF RESULTATER**3.1. Beregning og formler**

a) Ekstraktet udtrykt i masseprocent af produktet som leveret er lig med:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

▼B

hvor:

S = masseprocent af produktet som leveret

m_0 = massen i gram af den udtagne prøvemængde

m_1 = massen i gram af ekstraktet efter tørring

Som resultat tages det aritmetiske gennemsnit af de to bestemmelser, såfremt ingen gentagelse af bestemmelsen er nødvendig.

Resultatet udtrykkes med en decimal

- b) Ekstraktet kan udtrykkes i relation til tørstoffet ved anvendelse af følgende formel:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{ekstrakt i \% fedtstof/tørstof}$$

hvor:

S = masseprocent for ekstraktet af produktet som leveret (jf. a))

U = indhold af vand og flygtige stoffer.

3.2. Reproducerbarhed

Forskellen mellem resultaterne af de to samtidigt eller umiddelbart efter hinanden af samme analytiker foretagne bestemmelser, må ikke overstige 0,2 g ekstrakt ved hexan for 100 g prøve.

I modsat fald gentages analysen på to andre prøvemængder. Hvis forskellen også denne gang overstiger 0,2 g, tages som resultat det aritmetiske gennemsnit af de fire bestemmelser.



BILAG XVI

BESTEMMELSE AF IODTAL

1. ANVENDELSESOMRÅDE

Denne internationale standard specificerer en metode til bestemmelse af iodtallet i animalske og vegetabiliske fedtstoffer og olier, i det følgende benævnt fedtstoffer.

2. DEFINITION

Ved anvendelsen af denne internationale standard gælder følgende definition.

2.1. Iodtal: den mængde iod, der absorberes af prøven under de arbejdsbetingelser, der er specificeret i denne internationale standard.

Iodtallet udtrykkes som g iod pr. 100 g prøve.

3. PRINCIP

En prøve opløses i opløsningsmiddel, og der tilsættes Wijs reagens. Efter en nærmere fastsat tid tilsættes kaliumiodidopløsning og vand, og det frigjorte iod titreres med natriumthiosulfatopløsning.

4. REAGENSER

Alle reagenser skal være anerkendt analysekvalitet.

4.1. Vand, skal opfylde kravene i ISO 3696, grad 3.

4.2. Kaliumiodid — 100 g/l opløsning, der ikke indeholder iodat eller frit iod.

4.3. Stivelseopløsning.

5 g opløselig stivelse blandes i 30 ml vand, denne blanding tilsættes 1 000 ml kogende vand efterfulgt af kogning i 3 min. og afkøling.

4.4. Natriumthiosulfat — standardopløsning.

$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, som er standardiseret højst syv dage inden brug.

4.5. Opløsningsmiddel — tilberedes ved blanding af lige dele cyclohexan og eddikesyre.

4.6. Wijs reagens — indeholder iodmonochlorid i eddikesyre. Der benyttes kommercielt Wijs reagens.

5. APPARATUR

Normalt laboratorieudstyr og navnlig følgende:

5.1. Vejeskeer af glas, der passer til prøven og kan anbringes i kolberne (5.2).

5.2. Erlenmeyer-kolber, 500 ml, der er forsynet med slebne glaspropper og er helt tørre.

6. FORBEREDELSE AF ANALYSEPRØVEN

Den homogeniserede prøve tørres på natriumsulfat og filtreres.

7. FREMGANGSMÅDE

7.1. Prøven

Prøvens størrelse varierer alt efter dens forventede iodtal, jf. tabel 1.

▼B

Tabel 1

Forventet iodtal	Prøvens størrelse
under 5	3,00 g
5—20	1,00 g
21—50	0,40 g
51—100	0,20 g
101—150	0,13 g
151—200	0,10 g

Prøven afvejes til nærmeste 0,1 mg i en glasske (5.1).

7.2. Bestemmelse

Prøven kommes i en 500 ml kolbe (5.2). Der tilsættes 20 ml opløsningsmiddel (4.5) for at opløse fedtstoffet. Der tilsættes nøjagtig 25 ml Wijs reagens (4.6), proppen sættes i, indholdet omrystes med en roterende bevægelse, og kolben anbringes i mørke. Der må ikke benyttes mundpipette til Wijs reagenset.

På tilsvarende måde forberedes der en blindprøve med opløsningsmidlet og reagenset, men prøven udelades.

Når det gælder prøver med et iodtal på under 150, skal kolberne henstå i mørke i 1 time. Når det gælder prøver med et iodtal på over 150, polymeriserede produkter eller kraftigt iltede produkter, skal kolberne henstå i 2 timer.

Derefter tilsættes hver af kolberne 20 ml kaliumiodidopløsning (4.2) og 150 ml vand (4.1).

Der titreres med natriumthiosulfat i standardopløsning (4.4), indtil den gule farve, der skyldes iodet, næsten er forsvundet. Der tilsættes nogle få dråber stivelsesopløsning (4.3), og titreringen fortsætter, indtil den blå farve lige akkurat forsvinder efter meget kraftig omrystning.

Note: Potentiometrisk bestemmelse af slutpunktet kan tillades.

7.3. Antal bestemmelser

Der foretages to bestemmelser af samme prøve.

8. ANGIVELSE AF RESULTATER

Iodtallet angives som

$$\frac{12,69 \times c \times (V_1 - V_2)}{m}$$

hvor

c = den numeriske værdi af den eksakte koncentration (mol/l) af den benyttede natriumthiosulfat-standardopløsning (4.4)

V₁ = den numeriske værdi af den til blindprøven benyttede mængde (ml) natriumthiosulfat-standardopløsning (4.4)

▼B

V_2 = den numeriske værdi af den til bestemmelsen benyttede mængde (ml) natriumthiosulfat-standardopløsning (4.4)

m = den numeriske værdi af prøvens størrelse (g) (7.1).

Resultatet betragtes som det aritmetiske gennemsnit af de to bestemmelser under forudsætning af, at repeterbarhedskravet er opfyldt.

▼ **M11***BILAG XVII***METODE TIL BESTEMMELSE AF STIGMASTADIENER I VEGETABILSKE OLIER**

1. FORMÅL

Bestemmelse af stigmastadiener i vegetabiliske olier indeholdende lave koncentrationer af disse kulbrinter, navnlig i jomfruolie og råolie af olivenpresserester.

2. OMRÅDE

Metoden kan anvendes på alle vegetabiliske olier, selv om målinger kun er pålidelige, hvis indholdet af de pågældende kulbrinter er på mellem 0,01 og 4,0 mg/kg. Metoden er særligt velegnet til at påvise tilstedeværelsen af raffinerede vegetabiliske olier (oliven, olivenrester, solsikke, palme osv.) i jomfruolie, da raffinerede olier indeholder stigmastadiener, og jomfruolie ikke gør det.

3. PRINCIP

Isolation af uforsæbelige stoffer. Separation af den steroide kulbrinterfraktion ved søjlekromatografi på silicagel og analyse ved kapillargaskromatografi.

4. APPARATUR

4.1. 250 ml kolber, der er egnet til brug med tilbagesvaler

4.2. Skilletragte, kapacitet 500 ml

4.3. 100 ml rundbandede kolber

4.4. Rotationsfordamper

4.5. Kromatografisøjle af glas (1,5-2,0 cm indvendig diameter × 50 cm længde) med teflonprop og en tot glasuldsfibre eller sintret glasskive i bunden. Til tilberedning af en silicagelsøjle hældes hexan på kromatografisøjlen til en dybde på ca. 5 cm, hvorefter der fyldes op med en opløsning af silicagel i hexan (15 g i 40 ml) ved hjælp af små mængder hexan. Henstilles til bundfældning, som afsluttes med let sammenrystning. Der tilsættes vandfrit natriumsulfat til en højde på ca. 0,5 cm, og til slut elueres den overskydende hexan.

4.6. Gaskromatograf med flammeioniseringsdetektor, splitinjektor eller kold »on column«-injektor og en ovn, der kan programmeres til en nøjagtighed på ± 1 °C.

4.7. Kapillarsøjle med sintret silica til gaskromatografi (0,25 eller 0,32 mm indvendig diameter × 25 m længde) belagt med en 5 % phenylmethylsiliconefase, 0,25 µm filmtykkelse.

Note 1.

Der kan bruges andre søjler med lignende eller lavere polaritet.

4.8. Skriver/integrator med mulighed for integration over hver enkelt top.

4.9. 5-10 µl mikroinjektionssprøjte til gaskromatografi med cementeret nål.

4.10. Elektrisk varmekappe eller varmeplade.

▼M11

5. REAGENSER

Alle reagenser bør være af analytisk renhed, medmindre andet er angivet. Det benyttede vand bør være destilleret vand eller vand af mindst tilsvarende renhed.

- 5.1. Hexan eller blanding af alkaner med kogepunktsinterval på 65-70 °C destilleret med rektificeringssøjle.

Note 2.

Opløsningsmidlet skal være destilleret for at fjerne urenheder.

- 5.2. 96 v/v ethanol.

- 5.3. Vandfrit natriumsulfat.

- 5.4. 10 % alkoholisk kaliumhydroxidopløsning. Der tilsættes 10 ml vand til 50 g natriumoxid og omrøres. Derpå opløses blandingen i ethanol til 500 ml.

Note 3.

Alkoholisk kaliumhydroxid bliver brun ved henstand. Den bør tilberedes frisk hver dag og opbevares i godt tilproppede, brune glasflasker.

- 5.5. Silicagel 60 til søjlekromatografi, 70-230 mesh (Merck ref. 7734 el.lign.).

Note 4.

Normalt kan silicagel bruges direkte fra beholderen uden behandling. Imidlertid kan nogle batcher silica vise lav aktivitet, som giver ringe kromatografiske separationer. Derfor bør silicagelen behandles således: Silicagelen deaktiveres ved opvarmning i mindst fire timer ved 550 °C. Efter opvarmning anbringes silicagelen i en eksikator, hvor gelen afkøles, og derefter overføres silicagelen til en kolbe med prop. Der tilsættes 2 % vand og omrystes, til der ikke længere kan ses klumper, og pulveret flyder frit.

Hvis batcher af silicagel giver kromatogrammer med interfererende toppe, bør silicagelen behandles som beskrevet ovenfor. Som alternativ kan der benyttes ekstraren silicagel 60 (Merck ref. 7754).

- 5.6. Stamopløsning (200 ppm) af cholesta-3,5-dien (Sigma, 99 % renhed) i hexan (10 mg i 50 ml).

- 5.7. Standardopløsning af cholesta-3,5-dien i hexan ved en koncentration på 20 ppm fremkommet ved fortynding af ovennævnte opløsning.

Note 5.

Hvis opløsninger som nævnt i 5.6 og 5.7 holdes ved under 4 °C, forringes de ikke i løbet af i hvert fald de første fire måneder.

- 5.8. Opløsning af n-nonacosan i hexan i en koncentration på ca. 100 ppm.

- 5.9. Bæregas til kromatografi: helium eller hydrogen af 99,9990 % renhed.

- 5.10. Hjelpegasser til flammeioniseringsdetektor: hydrogen af 99,9990 % renhed og rensset luft.

▼ M11**6. FREMGANGSMÅDE****6.1. Fremstilling af uforsæbeligt stof:**

6.1.1. $20 \pm 0,1$ g olie afvejes i en 250 ml kolbe (4.1), der tilsættes 1 ml af standardopløsningen af cholesta-3,5-dien (20 µg) og 75 ml 10 % alkoholisk kaliumhydroxid, 10 %. Tilbagesvaleren påsættes, og der opvarmes til svag kogning i 30 minutter. Kolben med prøven fjernes fra varmekilden, og man lader opløsningen køle lidt (den må ikke afkøles helt, da prøven så vil stivne). Der tilsættes 100 ml vand, og opløsningen overføres til en skilletragt (4.2) ved hjælp af 100 ml hexan. Blandingen rystes kraftigt i 30 sekunder, hvorefter man lader den henstå, så lagene kan skilles.

Note 6.

Hvis der dannes en emulsion, som ikke hurtigt forsvinder, tilsættes der små mængder ethanol.

6.1.2. Den nedre vandige fase overføres til en anden skilletragt, og der ekstraheres igen med 100 ml hexan. Man lader igen den nedre fase løbe af, og hexanekstrakterne vaskes (samlet i en anden skilletragt) tre gange med hver gang 100 ml blanding af ethanol-vand (1: 1), indtil der opnås neutral pH-værdi.

6.1.3. Hexanopløsningen passerer gennem vandfrit natriumsulfat (50 g), vaskes med 20 ml hexan og inddampes i en rotationsfordamper ved 30 °C og lavt tryk, indtil den er tør.

6.2. Separation af den steroide kulbrintefraktion:

6.2.1. Det tilbageværende overføres til fraktioneringssøjlen ved hjælp af to 1 ml-portioner hexan. Man lader væskeniiveauet falde til toppen af natriumsulfatet, og den kromatografiske eluering startes med hexan ved en hastighed på ca. 1 ml/min. De første 25-30 ml af elueringen kasseres, og den følgende 40 ml fraktion opsamles. Efter opsamlingen overføres denne fraktion til en 100 ml rundbundet kolbe (4.3).

Note 7.

Den første fraktion indeholder mættede kulbrinter (jf. figur 1a) og den anden fraktion de steroide kulbrinter. Yderligere eluering giver squalen og relaterede forbindelser. For at opnå god separation mellem mættede og steroide kulbrinter kræves der optimering af fraktioneringsmængderne. Med henblik herpå justeres mængden af den første fraktion således, at når den anden fraktion analyseres, er de toppe, som repræsenterer de mættede kulbrinter, lave (jf. figur 1c). Hvis sådanne ikke fremkommer, men standardtoppens intensitet er lav, reduceres mængden. I hvert fald er en komplet separation mellem komponenterne i den første og den anden fraktion unødvendig, da der ikke er nogen overlappende toppe under gaskromatografianalyse, hvis betingelserne justeres som beskrevet i 6.3.1. Optimering af mængden af den anden fraktion er normalt unødvendig, da der er god separation fra de øvrige komponenter. Tilstedeværelsen af en høj top ved en retentionstid på ca. 1,5 min. mindre end standard skyldes squalen og angiver dårlig separation.

6.2.2. Den anden fraktion inddampes i en fordamper ved 30 °C og lavt tryk indtil tørhed, og restmængden opløses straks i 0,2 ml hexan. Opløsningen opbevares i køleskab indtil analyse.

Note 8.

Restmængder under 6.1.3 og 6.2.2 bør ikke opbevares tørt ved rumtemperatur. Så snart de er fremkommet, bør opløsningsmidlet tilsættes, og opløsningerne bør opbevares i køleskab.

▼ M11**6.3. Gaskromatografi**

6.3.1. Arbejdsbetingelser for splitinjektion:

- injektortemperatur: 300 °C
- detektortemperatur: 320 °C
- skriver/integrator: parametrene for integration bør sættes, så de giver en korrekt bedømmelse af arealerne. Integration over de enkelte toppe anbefales
- følsomhed: ca. 16 gange mindste dæmpning
- injiceret mængde opløsning: 1 µl
- ovnprogrammeringstemperaturer: initialtemperatur 235 °C i 6 min. og derefter stigende med 2 °C/min. indtil 285 °C
- injektor med splitforhold 1: 15
- bæregas: helium eller hydrogen ved ca. 120 kPa tryk.

Disse betingelser kan justeres alt efter kromatografens og søjlens evne til at give kromatogrammer, der imødekommer følgende krav: intern standardtop inden for ca. 5 min. af den tid, der er angivet i 6.3.2. Den interne standardtop bør være på mindst 80 % fuldt udslag.

Gaskromatografisystemet skal kontrolleres ved injektion af en blanding af stamopløsningen af cholestadien (5.6) og n-nonacosanopløsning (5.8). Cholesta-3,5-dientoppen skal vise sig før n-nonacosanen (jf. figur 1c). Hvis den ikke fremkommer, kan man vælge mellem to metoder: at bringe ovntemperaturen ned og/eller benytte mindre polære søjler.

6.3.2. Identifikation af toppe

Den interne standardtop viser sig efter ca. 19 min. og stigmasta-3,5-dien ved en relativ retentionstid på ca. 1,29 (jf. figur 1b). Sammen med med stigmasta-3,5-dien forekommer der små mængder af en isomer, som normalt kun giver en enkelt kromatografisk top. Hvis søjlen er for polær eller har stor opløsningsevne, kan isomeren imidlertid vise sig som en lille top før og nær på toppen for stigmasta-3,5-dien (jf. figur 2). For at sikre, at stigmastadienerne elueres som en top, er det tilrådeligt at erstatte søjlen med en mindre polære søjle eller med en søjle med større indvendig diameter.

Note 9.

Der kan fås en stigmastadienreference ved analyse af en raffineret vegetabilsk olie ved at benytte metoden til bestemmelser af steroide kulbrinter. Stigmastadiener fremkalder en signifikant og let identificerbar top.

6.3.3. Kvantitativ analyse

Indholdet af stigmastadiener bestemmes efter formlen:

$$\text{mg/kg stigmastadiener} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

▼ M11

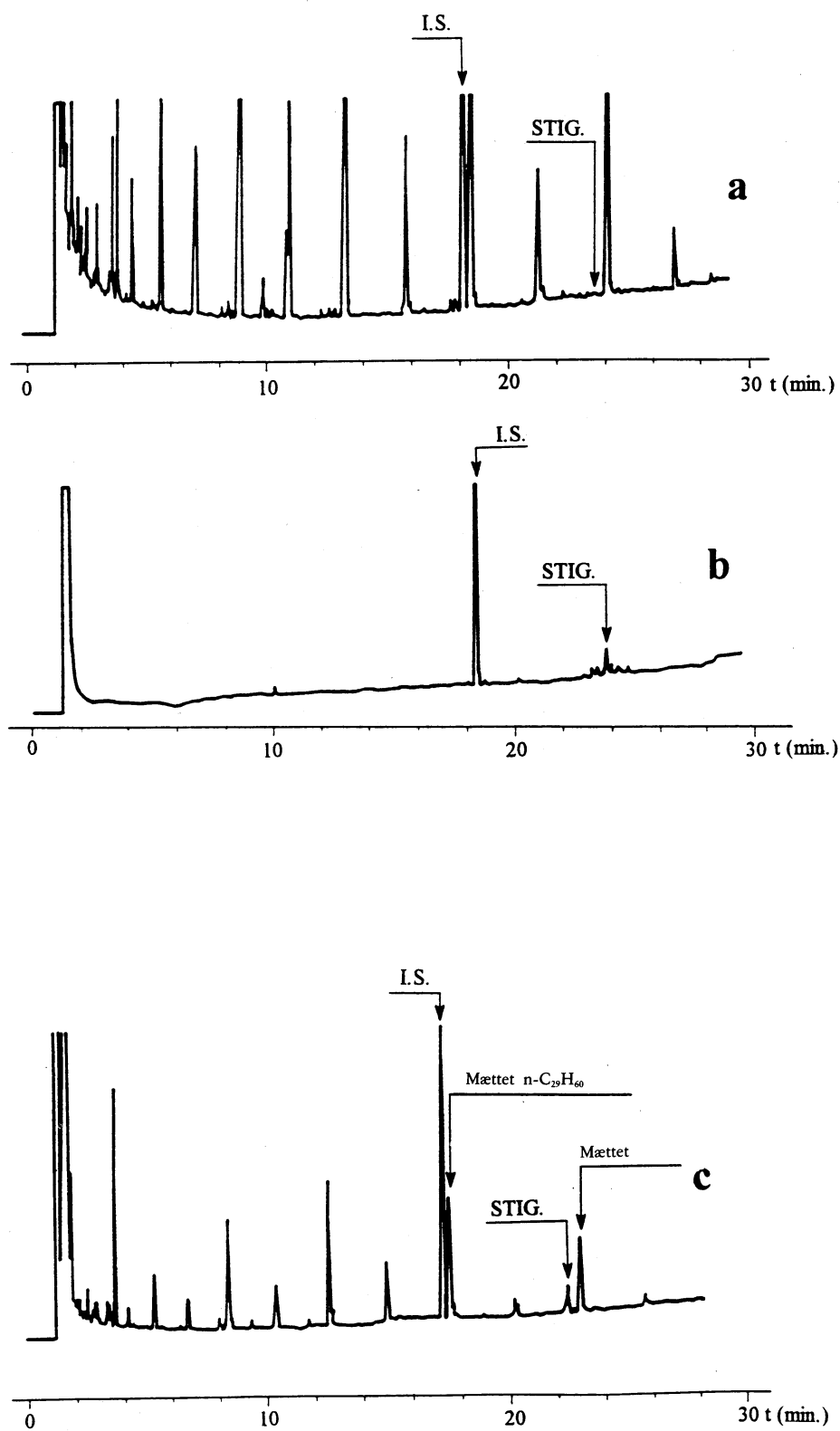
hvor: A_s = areal af stigmastadientop (hvis toppen er opløst i to isomerer, summen af de to toppes arealer)

A_c = areal af interne standard (cholestadien)

M_c = massen af tilsat standard i mikrogram

M_o = massen af olie i g.

Påvisningsgrænse: Ca. 0,01 mg/kg.

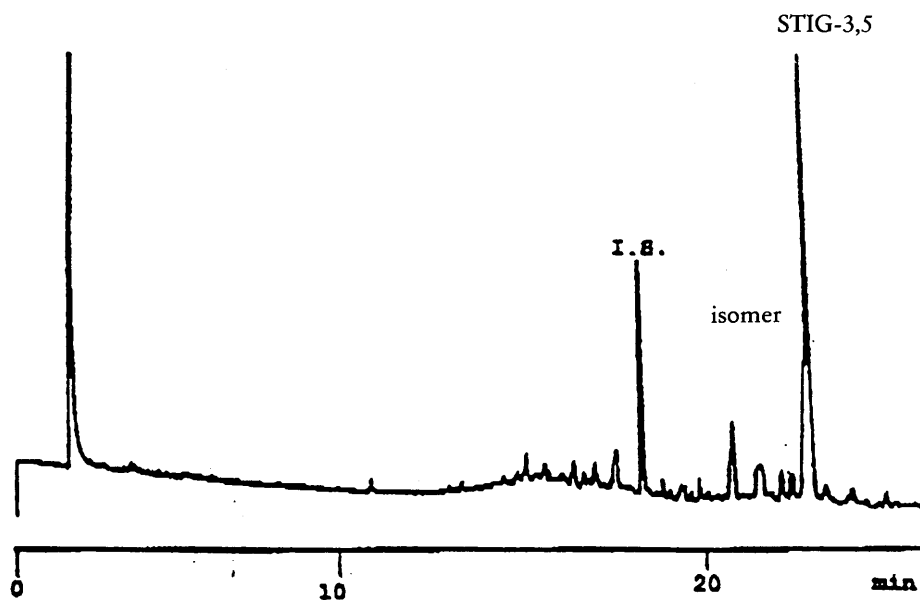
▼ M11

Figur 1

Gaskromatogrammer fra olivenolieprøver analyseret på en kapillarsøjle med sintret silica (0,25 mm indvendig diameter × 25 m), belagt med 5 % phenylmethylsilicone, 0,25 µm filmtykkelse.

▼ **M11**

- a) Første fraktion (30 ml) fra jomfruolie tilsat standardopløsning.
- b) Anden fraktion (40 ml) fra olivenolie indeholdende 0,10 mg/kg stigmastadiener.
- c) Anden fraktion (40 ml) indeholdende en lille smule af den første fraktion.

**Figur 2**

Gaskromatogrammer fra en prøve af raffineret olivenolie analyseret på en D-5-søjle, der viser stigmasta-3,5-diens isomer.

▼ **M25***BILAG XVIII***BESTEMMELSE AF FORSKELLEN MELLEM DET FAKTISKE OG DET TEORETISKE INDHOLD AF ECN 42-TRIACYLGLYCEROLER**

1. FORMÅL

Bestemmelse af den absolutte forskel mellem den værdi for triacylglyceroler (TAG) med et ækvivalent kulstofantal på 42 (ECN 42_{HPLC}), der bestemmes eksperimentelt ved HPLC-kromtografi af olien, og den teoretiske værdi for TAG med et ækvivalent kulstofantal på 42 (ECN 42_{theoretical}), der beregnes ud fra fedtsyresammensætningen.

2. ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden gælder for olivenolier. Den kan anvendes til at påvise tilstedeværelsen af små mængder frøolie (der har et højt indhold af linolsyre) i alle kategorier af olivenolie.

3. PRINCIP

Indholdet af ECN 42-triacylglyceroler bestemt ved HPLC-analyse og det teoretiske indhold af ECN 42-triacylglyceroler (beregnet på grundlag af GLC-bestemmelse af fedtsyresammensætningen) stemmer inden for visse grænser overens for ægte olivenolier. En større forskel end de værdier, der er fastsat for hver type olie, viser, at olien indeholder frøolier.

4. METODE

Metoden til beregning af det teoretiske indhold af ECN 42-triacylglyceroler og af forskellen mellem denne værdi og HPLC-data består hovedsagelig i samordning af analysedata, der er fremkommet ved andre metoder. Den kan opdeles i tre trin: bestemmelse af fedtsyresammensætningen ved hjælp af gaskromatografi på kapillarkolonne, beregning af den teoretiske sammensætning af ECN 42-triacylglyceroler og HPLC-bestemmelse af ECN 42-triacylglyceroler.

4.1. **Apparatur**

4.1.1. Rundkolber, 250 og 500 ml.

4.1.2. Bægerglas, 100 ml.

4.1.3. Glaskromatografikolonne, indvendig diameter 21 mm, længde 450 mm, med hane og standardslib (indvendigt) foroven.

4.1.4. Skilletragte, 250 ml, med standardslib (udvendigt) foroven, som passer øverst på kolonnen.

4.1.5. Glasstav, længde 600 mm.

4.1.6. Glastragt, diameter 80 mm.

4.1.7. Målekolber, 50 ml.

4.1.8. Målekolber, 20 ml.

4.1.9. Rotationsfordamper.

4.1.10. HPLC med mulighed for termostatstyring af kolonnetemperaturen.

4.1.11. Injektionsenheder à 10 µl.

4.1.12. Detektor: differentialrefraktometer. Følsomheden ved fuldt udslag bør være mindst 10⁻⁴ enheder.

▼ M25

4.1.13. Kolonne: rustfrit stålør, længde 250 mm og indvendig diameter 4,5 mm, fyldt med silicapartikler med diameter 5 µm med 22-23 % kulstof i form af octadecylsilan.

4.1.14. Databehandlingssoftware.

4.1.15. Glas med rummål ca. 2 ml, septum med teflonlag og skrueåbning.

4.2. Reagenser

Reagenserne skal være af analysekvalitet. Elueringsvæskerne bør være afgasset og kan recirkuleres adskillige gange uden indflydelse på adskillelsen.

4.2.1. Petroleumsether 40-60 °C, kromatografikvalitet, eller hexan.

4.2.2. Ethylether, peroxidfri, frisk destilleret.

4.2.3. Elueringsvæske til rensning af olien ved søjlekromatografi, blanding af petroleumsether/ethylether 87:13 (v/v).

4.2.4. Silicagel, 70-230 mesh, type Merck 7734, med standardiseret vandindhold på 5 % (w/w).

4.2.5. Glasuld.

4.2.6. Acetone til HPLC.

4.2.7. Acetonitril eller propionitril til HPLC.

4.2.8. Elueringsvæske til HPLC: acetonitril + acetone (i det indbyrdes forhold, der giver den ønskede adskillelse; der begynder med en blanding i forholdet 50:50) eller propionitril.

4.2.9. Opløsningsmiddel: acetone.

4.2.10. Referencetriacylglyceroler: enten anvendes triacylglyceroler, som fås i handelen (tripalmitin, triolein osv.), hvis retentionstider plottes mod det ækvivalente kulstofantal, eller der anvendes referencekromatogrammer af sojaolie, en blanding af sojaolie og olivenolie i forholdet 30:70 og ren olivenolie (se anmærkning 1 og 2 og figur 1, 2, 3 og 4).

4.2.11. Fastfaseekstraktionskolonne med 1 g silica-fase, 6 ml.

4.3. Prøveforberedelse

Da interfererende stoffer kan give falsk positive resultater, skal prøven altid oprenses ifølge IUPAC-metode 2.507, der anvendes til bestemmelse af polære forbindelser i friturefedt og -olier.

4.3.1. Forberedelse af kromatografikolonne

Kolonnen (4.1.3) fyldes med ca. 30 ml elueringsvæske (4.2.3), derefter indsættes lidt glasuld (4.2.5) i kolonnen, og ved hjælp af glasstaven (4.1.5) skubbes glasulden ned i bunden af kolonnen.

I et 100 ml bægerglas opslættes 25 g silicagel (4.2.4) i 80 ml elueringsvæske (4.2.3), som derefter overføres til kolonnen ved hjælp af en glastragt (4.1.6).

For at sikre sig, at al silicagelen er overført til kolonnen, skylles bægerglasset med elueringsvæsken, og skyllevæsken hældes ligeledes ned i kolonnen.

Der åbnes for hanen, så væsken kan løbe ud af kolonnen, indtil væskeoverfladen står ca. 1 cm over silicagelen.

▼ **M25**4.3.2. *Kolonnekromatografi*

2,5 ± 0,1 g olie, der om nødvendigt er filtreret, homogeniseret og tørret i forvejen, afvejes med 0,001 g nøjagtighed i en 50 ml målekolbe (4.1.7).

Olien opløses i ca. 20 ml elueringsvæske (4.2.3). Der kan om nødvendigt opvarmes svagt for at lette opløsningsprocessen. Der afkøles til stuetemperatur, og volumenet justeres med elueringsvæske.

Ved hjælp af en fuld pipette overføres der 20 ml opløsning til kolonnen, der er forberedt som beskrevet i 4.3.1, der åbnes for hanen, og væsken tappes af, indtil overfladen er på højde med silicagelen.

Der elueres dernæst med 150 ml elueringsvæske (4.2.3) med en hastighed på ca. 2 ml/min (det tager ca. 60-70 minutter at lade 150 ml løbe gennem kolonnen).

Eluatet opsamles i en 250 ml rundkolbe (4.1.1), der i forvejen er tareret og vejet nøjagtigt. Efter at væsken er inddampet på rotationsfordamper (4.1.9), vejes remanensen, som skal anvendes til fremstilling af opløsningen til HPLC-analyse og til fremstilling af methylester.

Udbyttet af prøven fra kolonnen skal være mindst 90 % for kategorierne ekstra jomfruolie, jomfruolie og raffineret olivenolie, og mindst 80 % for bomolie og olivenolie af presserester.

4.3.3. *Oprensning ved fastfaseekstraktion*

Fastfaseekstraktionskolonnen (SPE-kolonnen) aktiveres ved eluering med 6 ml hexan (4.2.3) under vakuum (undgå tørhed).

Der afvejes 0,12 g prøve i et 2 ml glas (4.1.5) med en nøjagtighed på 0,001 g, og den opløses i 0,5 ml hexan (4.2.3).

Opløsningen sættes på SPE-kolonnen, og der elueres med 10 ml hexan/diethylether (87:13, v/v) (4.2.3) under vakuum.

Den opsamlede fraktion inddampes til tørhed på rotationsfordamper (4.1.9) under reduceret tryk og ved stuetemperatur. Remanensen opløses i 2 ml acetone (4.2.6) til analyse af triacylglyceroler (TAG).

4.4. **HPLC-analyse**4.4.1. *Prøveforberedelse til kromatografianalyse*

Der fremstilles en 5 % opløsning af den prøve, der skal analyseres, ved, at der afvejes 0,5 ± 0,001 g af prøven i en 10 ml målekolbe, hvorefter der fyldes op til 10 ml med opløsningsmiddel (4.2.9).

4.4.2. *Fremgangsmåde*

Kromatografisystemet gøres klar. Der pumpes elueringsvæske (4.2.8) igennem med en hastighed af 1,5 ml/min. til rensning af hele systemet. Der ventes, indtil basislinjen er blevet stabil.

Derefter indsprøjtes 10 µl af prøven, der er forberedt som under 4.3.

4.4.3. *Beregning og angivelse af resultaterne*

Der anvendes arealnormalisering, dvs. at summen af de toparealer, der svarer til triacylglycerolerne med ECN 42 op til ECN 52, sættes til 100 %.

Den procentvise andel af hver triacylglycerol beregnes efter formlen:

$$\% \text{ triacylglycerol} = \text{topareal} \times 100 / \text{summen af toparealerne}$$

Resultaterne angives med mindst to decimaler.

Se anm. 1-4.

▼ **M25**4.5. **Beregning af triacylglycerolsammensætningen (molprocent) ud fra data om fedtsyresammensætningen (arealprocent)**4.5.1. *Bestemmelse af fedtsyresammensætningen*

Fedtsyresammensætningen bestemmes ifølge ISO 5508 på kapillarkolonne. Methylestrene fremstilles ifølge COI/T.20/dok. nr. 24.

4.5.2. *Fedtsyrer, der indgår i beregningen*

Glyceriderne grupperes på grundlag af deres ækvivalente kulstofantal (Equivalent Carbon Number — ECN) som anført i tabellen nedenfor. Der er kun medtaget fedtsyrer med 16 eller 18 kulstofatomer, fordi kun disse er af betydning for olivenolie. Fedtsyrerne bør normaliseres til 100 %.

Fedtsyre (FA)	Forkortelse	Molekylvægt (MW)	ECN
Palmitinsyre	P	256,4	16
Palmitolsyre	Po	254,4	14
Stearinsyre	S	284,5	18
Oliesyre	O	282,5	16
Linolsyre	L	280,4	14
Linolensyre	Ln	278,4	12

4.5.3. *Omregning af arealprocent til mol for alle fedtsyrer (1)*

$$\text{mol P} = \frac{\text{arealprocent P}}{\text{MW P}} \quad \text{mol S} = \frac{\text{arealprocent S}}{\text{MW S}} \quad \text{mol Po} = \frac{\text{arealprocent Po}}{\text{MW Po}}$$

$$\text{mol O} = \frac{\text{arealprocent O}}{\text{MW O}} \quad \text{mol L} = \frac{\text{arealprocent L}}{\text{MW L}} \quad \text{mol Ln} = \frac{\text{arealprocent Ln}}{\text{MW Ln}}$$

4.5.4. *Normalisering af fedtsyrer (mol) til 100 % (2)*

$$\text{molprocent P (1,2,3)} = \frac{\text{mol P} * 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{molprocent S (1,2,3)} = \frac{\text{mol S} * 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{molprocent Po (1,2,3)} = \frac{\text{mol Po} * 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{molprocent O (1,2,3)} = \frac{\text{mol O} * 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{molprocent L (1,2,3)} = \frac{\text{mol L} * 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{molprocent Ln (1,2,3)} = \frac{\text{mol Ln} * 100}{\text{mol (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

Resultaterne giver den procentvise andel af hver fedtsyre i molprocent i samtlige stillinger (1, 2 og 3) i triacylglycerolerne.

Derefter beregnes summen af de mættede fedtsyrer P og S (SFA) og de umættede fedtsyrer Po, O, L og Ln (UFA) (3):

$$\text{molprocent SFA} = \text{molprocent P} + \text{molprocent S}$$

$$\text{molprocent UFA} = 100 - \text{molprocent SFA}$$

▼ **M25**4.5.5. *Beregning af fedtsyresammensætningen i triacylglycerolernes 2- og 1,3-stilling*

Fedtsyrerne fordeles i tre grupper som følger: én for 2-stillingen og to identiske for 1- og 3-stillingen med forskellige koefficienter for de mættede syrer (P og S) og de umættede syrer (Po, O, L og Ln).

4.5.5.1. Mættede fedtsyrer i 2-stillingen [P(2) og S(2)] (4)

$$\text{molprocent P(2)} = \text{molprocent P (1,2,3)} * 0,06$$

$$\text{molprocent S(2)} = \text{molprocent S (1,2,3)} * 0,06$$

4.5.5.2. Umættede fedtsyrer i 2-stillingen [Po(2), O(2), L(2) og Ln(2)] (5)

$$\text{molprocent Po(2)} = \frac{\text{molprocent Po(1,2,3)}}{\text{molprocent UFA}} * (100 - \text{molprocent P(2)} - \text{molprocent S(2)})$$

$$\text{molprocent O(2)} = \frac{\text{molprocent O(1,2,3)}}{\text{molprocent UFA}} * (100 - \text{molprocent P(2)} - \text{molprocent S(2)})$$

$$\text{molprocent L(2)} = \frac{\text{molprocent L(1,2,3)}}{\text{molprocent UFA}} * (100 - \text{molprocent P(2)} - \text{molprocent S(2)})$$

$$\text{molprocent Ln(2)} = \frac{\text{molprocent Ln(1,2,3)}}{\text{molprocent UFA}} * (100 - \text{molprocent P(2)} - \text{molprocent S(2)})$$

4.5.5.3. Fedtsyrer i 1,3-stillingen [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) og Ln(1,3)] (6)

$$\text{molprocent P(1,3)} = \frac{\text{molprocent P(1,2,3)} - \text{molprocent P(2)}}{2} + \text{molprocent P(1,2,3)}$$

$$\text{molprocent S(1,3)} = \frac{\text{molprocent S(1,2,3)} - \text{molprocent S(2)}}{2} + \text{molprocent S(1,2,3)}$$

$$\text{molprocent Po(1,3)} = \frac{\text{molprocent Po(1,2,3)} - \text{molprocent Po(2)}}{2} + \text{molprocent Po(1,2,3)}$$

$$\text{molprocent O(1,3)} = \frac{\text{molprocent O(1,2,3)} - \text{molprocent O(2)}}{2} + \text{molprocent O(1,2,3)}$$

$$\text{molprocent L(1,3)} = \frac{\text{molprocent L(1,2,3)} - \text{molprocent L(2)}}{2} + \text{molprocent L(1,2,3)}$$

$$\text{molprocent Ln(1,3)} = \frac{\text{molprocent Ln(1,2,3)} - \text{molprocent Ln(2)}}{2} + \text{molprocent \% Ln(1,2,3)}$$

4.5.6. *Beregning af triacylglyceroler*

4.5.6.1. TAG'er med én fedtsyre (AAA, her LLL, PoPoPo) (7)

$$\text{molprocent AAA} = \frac{\text{molprocent A(1,3)} * \text{molprocent A(2)} * \text{molprocent A(1,3)}}{10\ 000}$$

4.5.6.2. TAG'er med to fedtsyrer (AAB, her PoPoL, PoLL) (8)

$$\text{molprocent AAB} = \frac{\text{molprocent A(1,3)} * \text{molprocent A(2)} * \text{molprocent B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{molprocent ABA} = \frac{\text{molprocent A(1,3)} * \text{molprocent B(2)} * \text{molprocent A(1,3)}}{10\ 000}$$

▼ **M25**

4.5.6.3. TAG'er med tre forskellige fedtsyrer (ABC, her OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

$$\text{molprocent ABC} = \frac{\text{molprocent A(1,3)} * \text{molprocent B(2)} * \text{molprocent C(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{molprocent BCA} = \frac{\text{molprocent B(1,3)} * \text{molprocent C(2)} * \text{molprocent A(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{molprocent CAB} = \frac{\text{molprocent C(1,3)} * \text{molprocent A(2)} * \text{molprocent B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

4.5.6.4. ECN 42-triacylglyceroler

ECN 42-triacylglycerolerne beregnes i overensstemmelse med ligning 7, 8 og 9 og opstilles i rækkefølge efter den forventede eluering i HPLC (normalt kun tre toppe).

LLL

PoLL og stillingsisomeren LPoL

OLLn og stillingsisomererne OLnL og LnOL

PoPoL og stillingsisomeren PoLPo

PoOLn og stillingsisomererne OPoLn og OLnPo

PLLn og stillingsisomererne LLnP og LnPL

PoPoPo

SLnLn og stillingsisomeren LnSLn

PPoLn og stillingsisomererne PLnPo og PoPLn.

ECN 42-triacylglycerolerne er givet ved summen af de ni triacylglyceroler og deres stillingsisomerer. Resultaterne angives med mindst to decimaler.

5. EVALUERING AF RESULTATERNE

Den beregnede teoretiske sammensætning og den sammensætning, der er bestemt ved HPLC-analysen, sammenlignes. Hvis den absolutte forskel mellem HPLC-dataene og de teoretiske data er større end de værdier, der er anført i handelsnormen for den pågældende oliekategori, indeholder prøven frøolie.

Resultaterne angives med én decimal.

6. EKSEMPEL (TALLENE HENVISER TIL AFSNITTENE I BESKRIVELSE AF METODEN)

— 4.5.1. *Beregning af molprocent fedtsyrer på grundlag af GLC-data (normaliserede arealprocenter)*

Der fremkommer følgende data for fedtsyresammensætningen ved GLC:

FA	P	S	Po	O	L	Ln
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Arealprocent	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

— 4.5.3 *Omregning af arealprocent til mol for alle fedtsyrer (se formel (1))*

$$\text{mol P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ mol P}$$

$$\text{mol S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ mol S}$$

$$\text{mol Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ mol Po}$$

$$\text{mol O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ mol O}$$

$$\text{mol L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ mol L}$$

$$\text{mol Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ mol Ln}$$

$$\text{I alt} = 0,35821 \text{ mol TAG}$$

— 4.5.4. *Normalisering af fedtsyrer (mol) til 100 % (se formel (2))*

$$\text{molprocent P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ mol P} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 10,887 \%$$

$$\text{molprocent S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ mol S} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 2,942 \%$$

$$\text{molprocent Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ mol Po} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 1,097 \%$$

$$\text{molprocent O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ mol O} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 74,116 \%$$

$$\text{molprocent L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ mol L} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 9,955 \%$$

$$\text{molprocent Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ mol Ln} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 1,002 \%$$

$$\text{Molprocent i alt} = 100 \%$$

Sum af mættede og umættede fedtsyrer i 1-, 2- og 3-stillingen i TAG'erne (se formel (3)):

$$\text{molprocent SFA} = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\text{molprocent UFA} = 100,000 \% - 13,829 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

— 4.5.5. *Beregning af fedtsyresammensætningen i triacylglycerolernes 2- og 1,3-stilling*

— 4.5.5.1 *Mættede fedtsyrer i 2-stillingen [P(2) og S(2)] (se formel (4))*

$$\text{molprocent P(2)} = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \text{ molprocent}$$

$$\text{molprocent S(2)} = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \text{ molprocent}$$

— 4.5.5.2 *Umættede fedtsyrer i 2-stillingen [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) og Ln(1,3)] (se formel (5))*

$$\text{molprocent Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \text{ molprocent}$$

$$\text{molprocent O(2)} = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \text{ molprocent}$$

$$\text{molprocent L(2)} = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \text{ molprocent}$$

$$\text{molprocent Ln(2)} = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \text{ molprocent}$$

▼ **M25**

- 4.5.5.3 Fedtsyrer i 1,3-stillingen [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) og Ln(1,3)] (se formel (6))

$$\text{molprocent P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \text{ molprocent}$$

$$\text{molprocent S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \text{ molprocent}$$

$$\text{molprocent \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \text{ molprocent}$$

$$\text{molprocent O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \text{ molprocent}$$

$$\text{molprocent L(1,3)} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \text{ molprocent}$$

$$\text{molprocent Ln(1,3)} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \text{ molprocent}$$

- 4.5.6. *Beregning af triacylglyceroler*

På grundlag af den beregnede fedtsyresammensætning i 2- og 1,3-stillingen:

FA i	1,3-stillingen	2-stillingen
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
I alt	100,0 %	100,0 %

beregnes følgende triglycerider:

LLL

PoPoPo

PoLL med en stillingsisomer

SLnLn med en stillingsisomer

PoPoL med en stillingsisomer

PPoLn med to stillingsisomerer

OLLn med to stillingsisomerer

PLLn med to stillingsisomerer

PoOLn med to stillingsisomerer

- 4.5.6.1. *TAG'er med én fedtsyre (LLL, PoPoPo) (se formel (7))*

$$\text{molprocent LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,09706 \text{ mol LLL}}$$

$$\text{molprocent PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,00013 \text{ mol PoPoPo}}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2 TAG'er med to fedtyrer (PoLL, SLnLn, PoPoL) (se formel (8))

$$\text{molprocent PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,02141$$

$$\text{molprocent LPoL} = \frac{9,204 \% * 1,262 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = 0,01069$$

0,03210 mol PoLL

$$\text{molprocent SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,325 \% * 1,153 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00092$$

$$\text{molprocent LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\ 000} = 0,00002$$

0,00094 mol SLnLn

$$\text{molprocent PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00236$$

$$\text{molprocent PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

— 4.5.6.3 TAG'er med tre forskellige fedtsyrer (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) (se formel (9))

$$\text{molprocent PPLn} = \frac{16,004 \% * 1,262 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00374$$

$$\text{molprocent LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,00012$$

$$\text{molprocent PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,00375$$

0,00761 mol PPLn

$$\text{molprocent OLLn} = \frac{68,526 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,14556$$

$$\text{molprocent LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,296 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,14555$$

$$\text{molprocent LLnO} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,14544$$

0,43655 mol OLLn

$$\text{molprocent PLLn} = \frac{16,004 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,03399$$

$$\text{molprocent LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00111$$

$$\text{molprocent LLnP} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,03397$$

0,06907 mol PLLn

▼ **M25**

$$\text{molprocent PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,296 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,01605$$

$$\text{molprocent LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,262 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,01603$$

$$\text{molprocent OLnPo} = \frac{68,526 \% * 1,153 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,01604$$

0,04812 mol PoOLn

ECN42 = 0,69512 mol TAG'er

Anmærkning 1: Elueringsrækkefølgen kan bestemmes ved beregning af det ækvivalente kulstofantal, ofte defineret ved udtrykket $ECN = CN - 2n$, hvor CN er kulstofantallet, og n er antallet af dobbeltbindinger; den kan beregnes mere nøjagtigt, hvis dobbeltbindingens placering tages i betragtning. Hvis n_o , n_l og n_{ln} er antallet af dobbeltbindinger i henholdsvis olie-, linol- og linolensyre, kan det ækvivalente kulstofantal beregnes efter formlen:

$$EN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

hvor koefficienterne d_o , d_l og d_{ln} kan beregnes ved hjælp af referencetriglyceriderne. Under de betingelser, der er specificeret ved denne metode, vil resultatet ligge tæt ved:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_l) - (2,17 n_{ln})$$

Anmærkning 2: Med flere referencetriglycerider er det også muligt at beregne opløsningsevnen med hensyn til triolein:

$$\alpha = RT^1 / RT \text{ triolein}$$

ved hjælp af den reducerede retentionstid $RT^1 = RT - RT \text{ opløsningsmiddel}$.

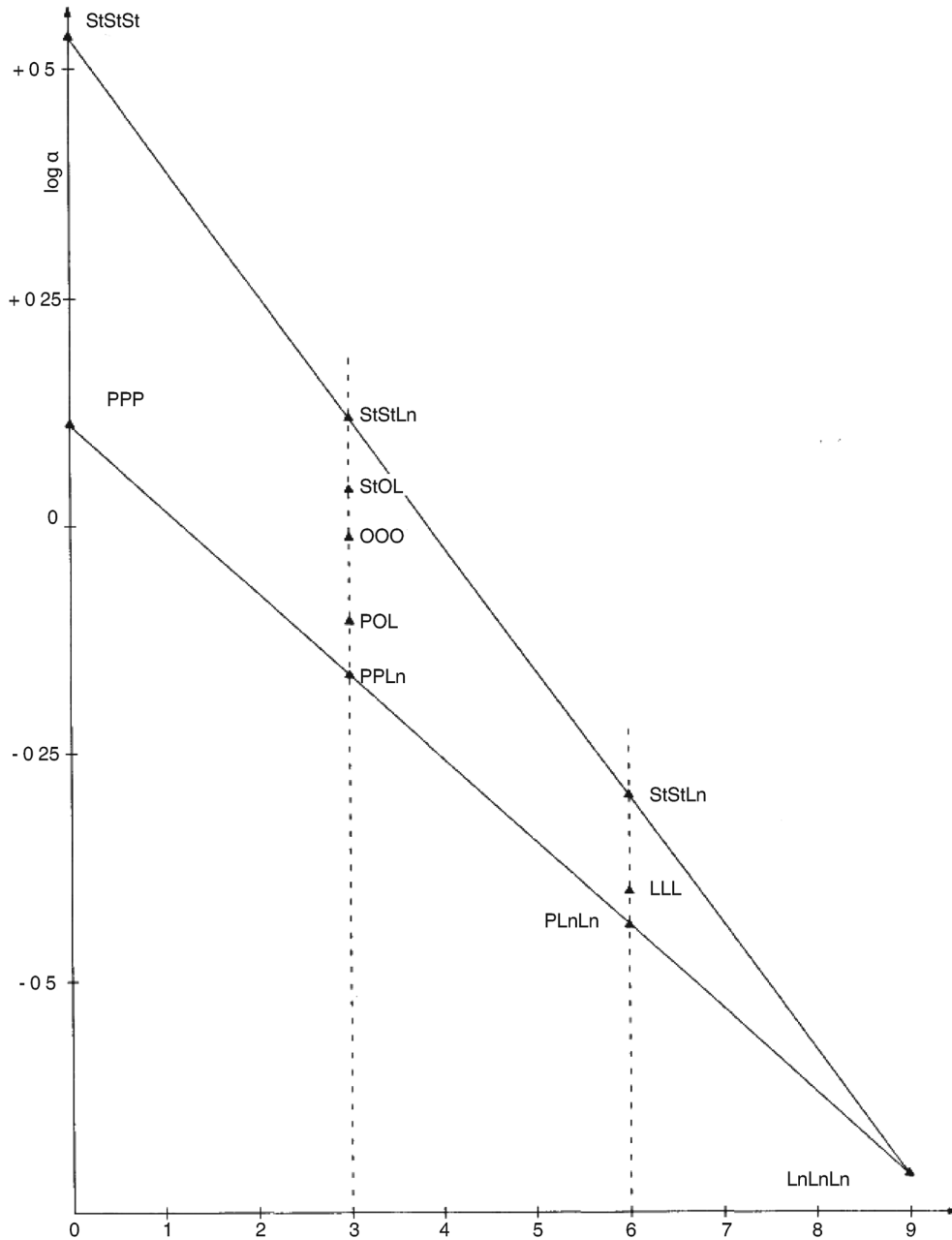
Ud fra en afbildning af $\log \alpha$ mod f (antal dobbeltbindinger) kan retentionstiderne for alle de triglycerider af fedtsyrer, som findes i referencetriglyceriderne, bestemmes (se figur 1).

Anmærkning 3: Kolonnen skal være så effektiv, at toppene af LLL (trilinolein) adskilles tydeligt fra toppene af de triglycerider, der har næsten samme retentionstid. Elueringen fortsættes, indtil ECN 52-toppen.

Anmærkning 4: Der sikres en præcis måling af alle relevante toparealer for denne bestemmelse, hvis den anden top svarende til ECN 50 giver 50 % af fuldt udslag på skriveren.

▼ M25

Figur 1

Afbildning af $\log \alpha$ mod f (antal dobbeltbindinger)

Antal dobbeltbindinger

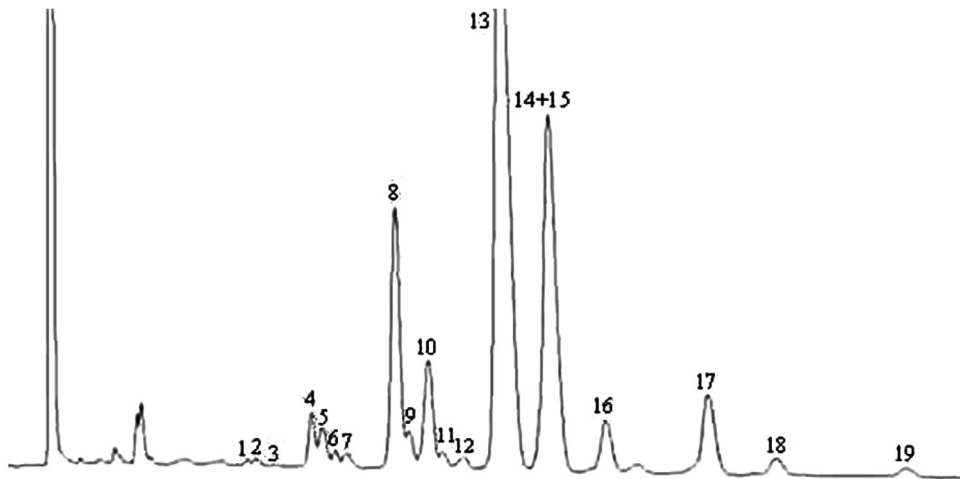
La: laurinsyre; My: myristinsyre; P palmitinsyre; S stearinsyre; O oliesyre; L linolsyre; Ln linolensyre;

▼ **M25**

Figur 2

Olivenolie med lavt indhold af linolsyre

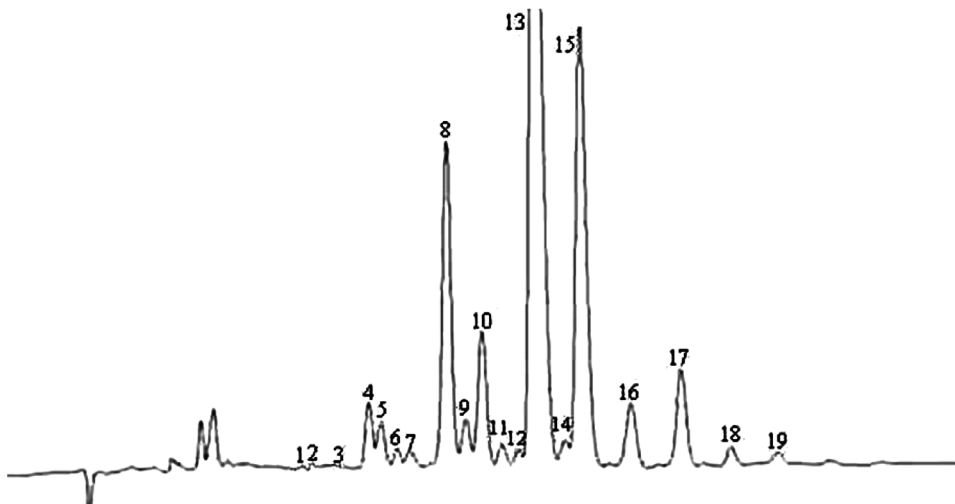
a



Med opløsningsmiddel: acetone/acetonitril.

PROFIL a: Hovedkomponenter i kromatogramtoppene: **ECN42** (1) LLL + PoLL; (2) OLLn + PoOLn; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL + PoOL; (5) OOLn + PLL; (6) POLn + PPOPo; (7) OOL + PoOO; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14 + 15) SOL + POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS.

b



Med opløsningsmiddel: propionitril

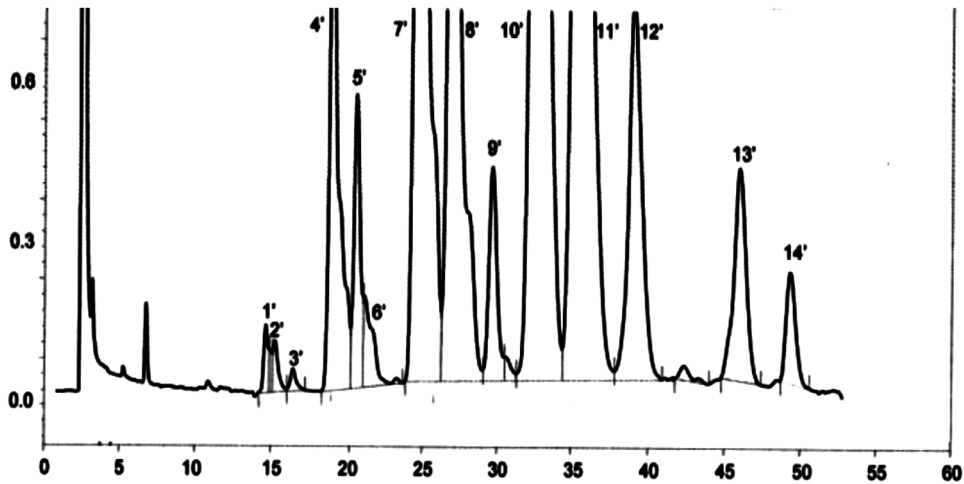
PROFIL b: Hovedkomponenter i kromatogramtoppene: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS

▼ M25

Figur 3

Olivenolie med højt indhold af linolsyre

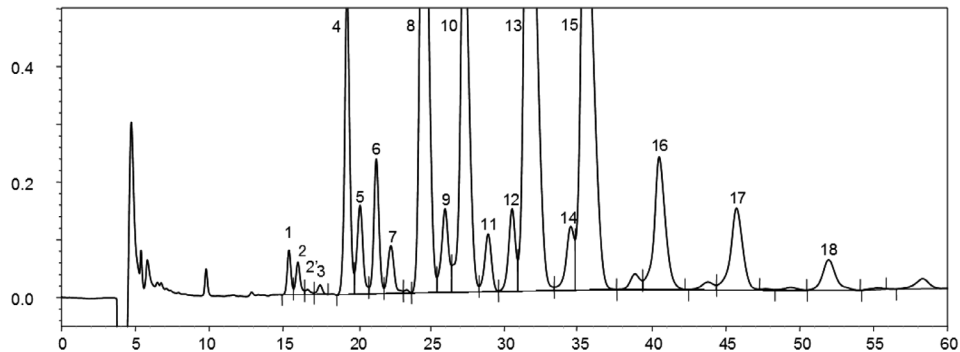
a



Med opløsningsmiddel: acetone/acetonitril (50:50).

Profil a: Hovedkomponenter i kromatogramtoppene: **ECN42**: (1«) LLL + PoLL; (2«) OLLn + PoOLn; (3«) PLLn; **ECN44**: (4«) OLL + PoOL; (5«) OOLn + PLL; (6«) POLn + PPOPo; **ECN46**: (7«) OOL + PoOO; (8«) PLO + SLL + PoOP; (9«) PLP + PoPP; **ECN48**: (10«) OOO; (11«) POO + SLL + PPOo; (12«) POP + PLS; **ECN50**: (13«) SOO; (14«) POS + SLS

b



Med opløsningsmiddel: propionitril

Profil b: Hovedkomponenter i kromatogramtoppene: **ECN42**: (1) LLL; (2 + 2«) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; **ECN48**: (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS; **ECN52**: (19) AOO.

▼ M19*BILAG XIX***▼ M28****BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF ALIFATISKE ALKOHOLER OG TRITERPENALKOHOLER VED GASKROMATOGRAFI PÅ KAPILLARKOLONNE**

1. GENSTAND

I dette bilag beskrives en fremgangsmåde til at bestemme indholdet af alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer i olier og fedtstoffer.

▼ M19

2. METODENS PRINCIP

Fedtstoffer, tilsat 1-eicosanol som intern standard, forsæbes med kaliumhydroxid i ethanopløsning, hvorefter de ikke-forsæbelige stoffer ekstraheres med diethylether. Alkoholfraktionen separeres fra ekstrakten af ikke-forsæbelige stoffer ved kromatografi på basiske kiselgelpalader. De alkoholer, der er indvundet fra kiselgelen, omdannes til trimethylsilylethere og analyseres ved gaskromatografi på kapillarsøjle.

3. APPARATUR

- 3.1. 250 ml kolbe monteret med en refluxsvale med samlinger med glasslib
- 3.2. 500 ml skilletragt
- 3.3. 250 ml kolber
- 3.4. komplet apparatur til analyse ved tyndtlagskromatografi med 20 × 20 cm glasplader.
- 3.5. ultraviolet lampe med en bølgelængde på 366 eller 254 nm
- 3.6. 100 og 500 µl mikrosprøjter
- 3.7. en cylindrisk filtertragt med G3-glasfritte (porøsitet 15-40 µm), med en diameter på ca. 2 cm og en højde på ca. 5 cm, egnet til vakuumfiltrering og med et 12/21 udvendigt konisk glasslib
- 3.8. en 50 ml konisk vakuumkolbe med et 12/21 indvendigt konisk glasslib, som filtertragten (punkt 3.7) kan monteres på
- 3.9. et 10 ml prøverør med konisk bund og tætsluttende prop
- 3.10. en gaskromatograf, der er egnet til brug med kapillarsøjle, har et splitter-system og består af:
 - 3.10.1. et termostat-kammer til søjler, som kan opretholde den ønskede temperatur med en nøjagtighed på 1 °C
 - 3.10.2. en injektionsenhed med temperaturindstilling, med et fordampningselement af silanglas
 - 3.10.3. en flammeioniseringsdetektor og en omformer-forstærker
 - 3.10.4. en integrerende skriver, der er egnet til brug med omformer-forstærkeren (punkt 3.10.3), og som har en svartid på ikke over ét sekund og variabel papirhastighed
- 3.11. en kapillarsøjle af glas eller kvartsglas, med en længde på 20-30 m, en indre diameter på 0,25-0,32 mm, indvendig belagt med SE-52- eller SE-54-væskefase eller tilsvarende i en ensartet tykkelse på mellem 0,10 og 0,30 µm
- 3.12. en 10 µl gaskromatografi-mikrosprøjte med hærdet kanyle.
- 3.13. præcisionsvægt med en følsomhed på 1 mg (angivelse af 0,1 mg).

▼ M19

4. REAGENSER
 - 4.1. kaliumhydroxid, ca. 2 N, i ethanolopløsning: 130 g kaliumhydroxid (titer: min. 85 %) opløses i 200 ml destilleret vand under afkøling, og der fyldes op med ethanol til 1 liter. Opløsningen opbevares i veltilproppede, mørke glasflasker
 - 4.2. diethylether, analysereen
 - 4.3. vandfrit natriumsulfat, analyserent
 - 4.4. glasplader belagt med kiselgel uden fluorescensindikator, tykkelse 0,25 mm (kan fås brugsfærdige i handelen)
 - 4.5. kaliumhydroxid, ca. 0,2 N, i ethanolopløsning: 13 g kaliumhydroxid opløses i 20 ml destilleret vand, og der fyldes op med ethanol til 1 liter
 - 4.6. benzen, til kromatografi (punkt 5.2.2)
 - 4.7. acetone, til kromatografi (punkt 5.2.2)
 - 4.8. hexan, til kromatografi (punkt 5.2.2)
 - 4.9. diethylether, til kromatografi (punkt 5.2.2)
 - 4.10. chloroform, analysereen

▼ M28

- 4.11. Referenceopløsning til tyndtlagskromatografi: C₂₀-C₂₈-alkoholer 0,5 % i chloroform, eller en fraktion af alkoholer, fremstilles som angivet i punkt 5.2 af det uforsæbelige stof i en olie af olivenpresserester.

▼ M19

- 4.12. 2,7-dichlorfluorescein, 0,2 %-opløsning i ethanol. Gøres svagt basisk ved tilsætning af nogle få dråber 2 N alkoholisk kaliumhydroxidopløsning
- 4.13. vandfri pyridin til kromatografi
- 4.14. hexamethyldisilazan
- 4.15. trimethylchlorsilan
- 4.16. standardopløsninger af trimethylsilylethere (TMSE) af de alifatiske alkoholer fra C₂₀ til C₂₈, friskfremstillede ud fra blandinger af rene alkoholer
- 4.17. 1-eicosanol, 0,1 % (m/v)-opløsning i chloroform (intern standard)
- 4.18. bæregas: hydrogen eller helium, ren, til gaskromatografi
- 4.19. hjælpegas: nitrogen, ren, til gaskromatografi.

5. FREMGANGSMÅDE**5.1. Fremstilling af de uforsæbelige stoffer**

- 5.1.1. Et rumfang 0,1 %-1-eicosanolopløsning i chloroform (punkt 4.17), der indeholder en mængde 1-eicosanol (man kan ligeledes anvende 1-eneicosanol) svarende til ca. 10 % af indholdet af alifatiske alkoholer i den del af prøven, der er taget ud til bestemmelsen, overføres til 250 ml-kolben ved hjælp af 500 µl-mikrosprøjten. F.eks. sættes til 5 g af prøven 250 µl 0,1 %-1-eicosanolopløsning, hvis undersøgelsen gælder oliveolier eller frøolier, og 1 500 µl, hvis det gælder olie fra olivenpresserester.

Prøven inddampes til tørhed i en nitrogenstrøm, hvorefter 5 g af den tørrede, filtrerede prøve afvejes nøjagtigt og overføres til den samme kolbe.

▼ M19

5.1.2. 50 ml 2 N-opløsning af kaliumhydroxid i ethanol tilsættes, reflux-svaleren påsættes, og væsken opvarmes til svag kogning på vandbad under vedvarende, kraftig omrøring, indtil forsæbningen er sket (opløsningen bliver klar). Opvarmningen fortsættes i endnu 20 minutter, derefter tilsættes 50 ml destilleret vand ovenfra gennem svaleren, svaleren tages af, og kolben afkøles til ca. 30 °C.

5.1.3. Kolbens indhold overføres kvantitativt til en 500 ml-skilletragt, idet der skylles flere gange med destilleret vand, i alt ca. 50 ml. Ca. 80 ml diethylether tilsættes, tragten rystes kraftigt i ca. 30 sekunder og får lov til at henstå (note 1).

Den nedre vandige fase tappes af og opsamles i en anden skilletragt. Yderligere to ekstraktioner foretages på den vandige fase på samme måde, idet der bruges 60-70 ml diethylether hver gang.

Note 1: En eventuel emulsion kan brydes ved tilsætning af en lille mængde ethyl- eller methylalkohol ved hjælp af en spray.

5.1.4. Etherekstrakterne samles i én skilletragt og vaskes med destilleret vand (50 ml ad gangen), indtil vaskevandet giver neutral reaktion.

Når vaskevandet er fjernet, tørres ekstrakterne med vandfrit natrium-sulfat og filtreres over vandfrit natriumsulfat ned i en på forhånd vejte 250 ml-kolbe, idet tragt og filter vaskes med små mængder diethylether.

5.1.5. Ethern destilleres ned til nogle få ml og bringes derefter til tørhed under et let undertryk eller i en nitrogenstrøm, tørres fuldstændigt i en ovn ved 100 °C i ca. 15 minutter og vejes efter afkøling i en ekssikkator.

5.2. Separation af alkoholfraktionen

5.2.1. Forberedelse af de basiske plader: Kiselgelpladerne (punkt 4.4) nedsænkes fuldstændigt i 0,2 N-opløsningen af kaliumhydroxid i ethanol (punkt 4.5) i 10 sekunder, tørrer under emhætte i 2 timer og sættes til sidst i en ovn ved 100 °C i 1 time.

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

Note 2: Når basiske kiselgelplader benyttes til at separere alkoholfraktionen, er det ikke nødvendigt at behandle de ikke-forsæbelige stoffer med aluminiumoxid. På denne måde holdes alle sure forbindelser (fedtsyrer og andre syrer) tilbage på basislinjen, og båndet med alifatiske alkoholer og terpenalkoholer bliver klart adskilt fra sterolbåndet.

5.2.2. Der hældes 65:35 (v/v)-hexan/ethyletherblanding i kromatografikammeret til en højde på ca. 1 cm ⁽¹⁾.

Kammeret lukkes med det dertil passende låg og henstår i ca. en halv time, så at der opnås ligevægt mellem væske og damp. Strimler af filterpapir, der dypper ned i eluenten, kan anbringes på kammerets indre overflader. Dette reducerer elueringstiden med ca. en tredjedel og giver en mere ensartet og regelmæssig eluering af komponenterne.

⁽¹⁾ I disse tilfælde i særdeleshed benyttes 95:5 (v/v)-benzen/acetoneblandingen for at opnå god adskillelse af båndene.

▼ M19

Note 3: Kromatografblandingen bør udskiftes for hver test for at opnå fuldstændig reproducerbare elueringsbetingelser.

- 5.2.3. Der fremstilles en ca. 5 %-opløsning af de ikke-forsæbelige stoffer (punkt 5.1.5) i chloroform. Med 100 µl-mikrosprøjten afsættes med 0,3 ml af denne opløsning på en kromatografplade (punkt 5.2.1), ca. 2 cm fra den ene ende, en streg, som er så tynd og ensartet som muligt. På linje med strengen placeres 2-3 µl af alkoholreferenceopløsningen (punkt 4.11) i den ene ende af pladen, så båndet med de alifatiske alkoholer kan identificeres efter eluering.
- 5.2.4. Pladen anbringes i kromatografkammeret, der er forberedt som angivet i punkt 5.2.2. Temperaturen bør holdes mellem 15 og 20 °C. Kammeret lukkes straks med låget, og der elueres, indtil opløsningsmiddelfronten er ca. 1 cm fra pladens øverste kant.

Derpå fjernes pladen fra kromatografkammeret, og man lader opløsningsmidlet fordampe i en strøm af varm luft eller ved at lade pladen stå en kort tid under emhætte.

▼ M28

- 5.2.5. Pladen sprøjtes let og ensartet med 2',7'-dichlorfluoresceinopløsningen, når pladen observeres under ultraviolet lys. Båndet med alifatiske alkoholer identificeres ved, at det ligger på linje med pletten fra referenceopløsningen, hvorefter båndet med alifatiske alkoholer og båndet umiddelbart derover, som indeholder triterpenalkoholer, markeres med en sort blyant (Note 4).

Note 4: Anvisningen om at udtage både båndet med alifatiske alkoholer og båndet med triterpenalkoholer skyldes, at under denne metodes betingelser er der en betydelig mængde alifatiske alkoholer i båndet med triterpenalkoholer. I figur 1 i tillægget er vist et eksempel på adskillelse ved hjælp af tyndtlagskromatografi.

- 5.2.6. Med en metalspatel skræbes silicagelen i det markerede område af. Det fjernede materiale pulveriseres fint og placeres i filtertragten (3.7). Der tilsættes 10 ml varm chloroform, bland omhyggeligt med metalspatelen og filtrer under vakuum; filtratet opsamles i den koniske kolbe (3.8), der er forbundet med filtertragten.

Silicagelen i tragten vaskes tre gange med ethylether (ca. 10 ml ad gangen), idet filtratet samles i den samme kolbe, der er forbundet med filtertragten. Filtratet inddampes til et rumfang på 4-5 ml, som overføres til det på forhånd vejede 10 ml prøverør (3.9), og der inddampes til tørhed med let opvarmning i en svag strøm af nitrogen. Remanensen genopløses i nogle få dråber acetone, der inddampes igen til tørhed, røret placeres i en ovn ved 105 °C i ca. 10 minutter, og det afsvales i en ekssikator og vejes.

Remanensen i prøverøret udgør alkoholfraktionen.

▼ M19**5.3. Fremstilling af trimethylsilylethere (TMSE)**

- 5.3.1. Til prøverøret med alkoholfraktionen sættes silyleringsreagenset, der består af en 9:3:1 (v/v/v)-blanding af pyridin/hexamethyl-disilazan-/trimethylchlorsilan (note 5), i en mængde af 50 µl pr. milligram alkohol, idet enhver optagelse af fugt undgås (note 6).

▼ **M19**

Note 5: Brugsfærdige opløsninger kan fås i handelen. Man kan også få andre silyleringsreagenser som f.eks. bis-trimethylsilyltrifluoracetamid + 1 % trimethylchlorsilan, som skal fortyndes med et lige så stort rumfang vandfri pyridin.

Note 6: Den lette opalivering, som kan fremkomme, er normal og giver ikke anledning til interferens. Hvis der dannes hvide fnug eller fremkommer en lyserød farve, er det tegn på, at der er fugt til stede, eller at reagentet ikke er i orden. Hvis det forekommer, må prøven gentages.

5.3.2. Prøverøret tilproppes, rystes omhyggeligt (uden at vende bunden i vejret på det), indtil alkoholerne er fuldstændig opløst. Efter mindst 15 minutters henstand ved stuetemperatur centrifugeres der i nogle få minutter. Den klare opløsning er parat til gaskromatografisk analyse.

5.4. **Gaskromatografisk analyse**

5.4.1. Forberedende operationer, konditionering af søjlen

5.4.1.1. Søjlen monteres i gaskromatografen, idet indløbsenden forbindes med injektoren, der står i forbindelse med splittersystemet, og udløbsenden forbindes med detektoren. Der foretages en generel kontrol af gaskromatografienheden (lækager fra gaskredsløbene, detektorens effektivitet, splittersystemets og skriversystemets effektivitet osv.).

5.4.1.2. Hvis søjlen skal bruges for første gang, anbefales det, at den underkastes en konditionering. Man lader en svag gasstrøm passere gennem søjlen og tænder så for gaskromatografienheden, derefter begynder man gradvis at varme op til en temperatur mindst 20 °C over driftstemperaturen (note 7). Denne temperatur opretholdes i mindst 2 timer, derefter sættes hele systemet i driftstilstand (justering af gasstrømme og splitter, antændelse af flammen, forbindelse til den elektroniske skriver, justering af søjlekammeret, detektorens og injektorens temperatur osv.), og derefter optegnes signalet med en følsomhed, der er mindst to gange større end den, man agter at anvende til analysen. Basislinjens forløb skal være lige, uden toppe af nogen art, og den må ikke drive. Drivning nedad af en lige linje tyder på lækage fra søjlens forbindelser, drivning opad tyder på utilstrækkelig konditionering af søjlen.

Note 7: Konditioneringstemperaturen skal altid være mindst 20 °C lavere end den maksimumtemperatur, der er angivet for den anvendte stationære fase.

5.4.2. Valg af driftsbetingelser

5.4.2.1. Der anbefales følgende vejledende driftsbetingelser:

— søjletemperatur: først konstant temperatur 180 °C i 8 minutter, derefter programmeret stigning med 5 °C/minut op til 260 °C og endelig 15 minutter ved 260 °C

— fordampertemperatur: 280 °C

— detektortemperatur: 290 °C

— bæregassens lineære hastighed: helium 20-35 cm/s, hydrogen 30-50 cm/s

— splitterforhold: fra 1:50 til 1:100

— instrumentets følsomhed: fra 4 til 16 gange den minimale dæmpning

▼ M19

- registreringsfølsomhed: 1-2 mV fuld skala
- papirhastighed: 30-60 cm/time
- mængde stof injiceret: 0,5-1 µl TMSE-opløsning.

Disse betingelser kan varieres alt efter søjlens og gaskromatografens egenskaber, så man opnår kromatogrammer, der opfylder følgende krav:

- Retentionstiden for C₂₆-alkohol skal være 18 ± 5 minutter.
- Toppen for C₂₂-alkohol skal være 80 ± 20 % af fuld skala for olivenolie og 40 ± 20 % af fuld skala for frøolier.

- 5.4.2.2. For at kontrollere ovenstående krav foretages gentagne injektioner af prøveblandinger af alkohol-TMSE, og driftsbetingelserne justeres, så de bedste resultater opnås.
- 5.4.2.3. Integrationsparametrene for toppene må fastsættes sådan, at de giver korrekte værdier for de relevante toppe.
- 5.4.3. Udførelse af analysen
- 5.4.3.1. Med 10 µl-mikrosprøjten opsuges 1 µl hexan, 0,5 µl luft og derefter 0,5-1 µl af prøveopløsningen. Stemplet trækkes længere ud, så kanylen tømmes. Kanylen trykkes gennem injektionens membran, og efter 1-2 sekunder injiceres hurtigt; derefter fjernes kanylen langsomt efter ca. 5 sekunder.
- 5.4.3.2. Skriveren skal køre, indtil alle alkohol-TMSE er fuldstændig elueret. Basislinjen skal til stadighed opfylde kravene (punkt 5.4.1.2).

▼ M28

- 5.4.4. Identifikation af toppene

De enkelte toppe identificeres på basis af retentionstiderne og ved sammenligning med blandinger af standard-TMSE-blandingen, der er analyseret under de samme betingelser.

Figur 2 og 3 i tillægget viser eksempler på kromatogrammer for alkoholfraktionen af en raffineret olivenolie.

▼ M19

- 5.4.5. Kvantitativ vurdering
- 5.4.5.1. Toparealerne for 1-eicosanol og de alifatiske alkoholer C₂₂, C₂₄, C₂₆ og C₂₈ beregnes ved hjælp af integratoren.
- 5.4.5.2. Koncentrationen af de enkelte simple alifatiske alkoholer beregnes i mg pr. 1 000 g fedtstof som følger:

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

hvor:

A_x = toparealet for alkohol x

A_s = arealet af 1-eicosanoltoppen

m_s = massen af tilsat 1-eicosanol i milligram

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

6. ANGIVELSE AF RESULTATER

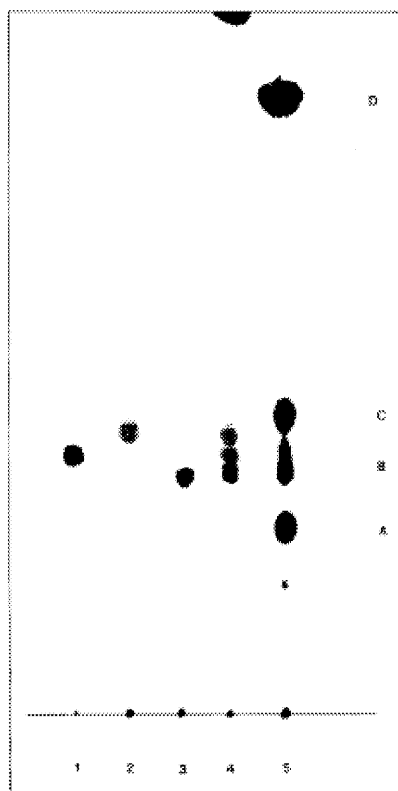
Koncentrationerne af simple alifatiske alkoholer angives i mg pr. 1 000 g fedtstof og deres sum som »total mængde alifatiske alkoholer«.

▼ M28*Tillæg*

Eksempel på adskillelse ved hjælp af tyndtlagskromatografi og eksempler på kromatogrammer

Figur 1

Tyndtlagskromatografiplade af den uforsæbelige fraktion af olivenolie, der er elueret med hexan/ethylether (65/35)

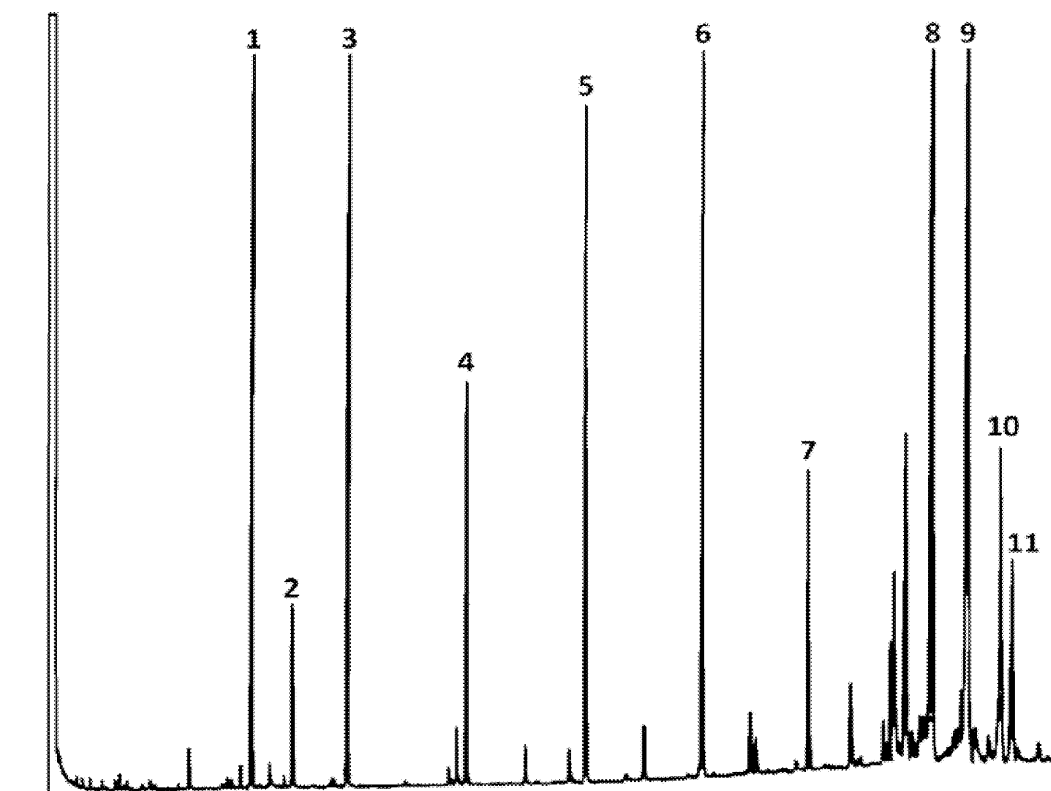


- | | | | |
|---|---|---|----------------------|
| 1 | C ₂₆ -alkohol | A | Steroler |
| 2 | C ₃₀ -alkohol | B | Alifatiske alkoholer |
| 3 | C ₂₀ -alkohol | C | Triterpenalkoholer |
| 4 | Blanding af C ₂₀₋₂₂₋₂₆₋₃₀ -alkoholer | D | Squalen |
| 5 | Uforsæbeligt stof i ekstra jomfruolie | | |

▼ M28

Figur 2

Kromatogram af alkoholfraktionen af en raffineret olivenolie



1 = Phytol

2 = Geranylgeraniol

3 = Alcohol C₂₀ (IS)4 = C₂₂-alkohol5 = C₂₄-alkohol6 = C₂₆-alkohol7 = C₂₈-alkohol

8 = Cycloartenol

9 = 24-methylen-cycloartenol

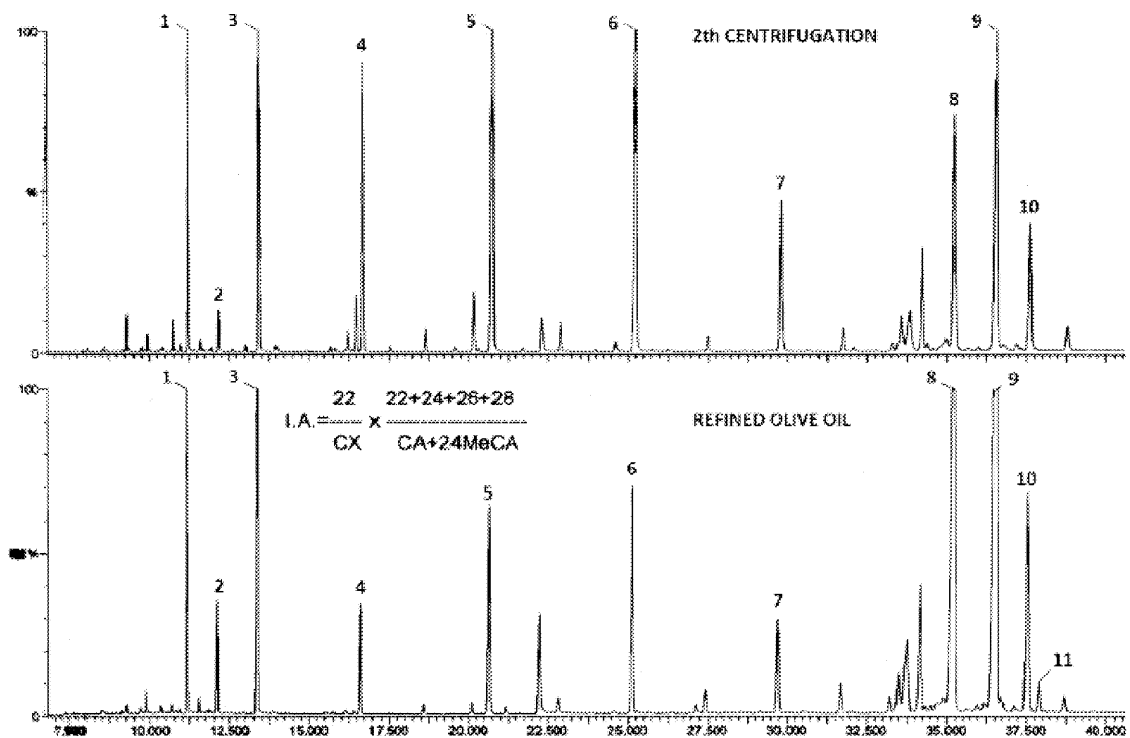
10 = Citrostadienol

11 = Cyclobranol

▼ M28

Figur 3

Alifatiske alkoholer og triterpenalkoholer i en raffineret olivenolie og i en olivenolie efter anden centrifugering



1 = Phytol

5 = C₂₄-alkohol9 = 24-methylen-cycloartenol
(24MeCA)

2 = Geranylgeraniol (CX)

6 = C₂₆-alkohol

10 = Citrostadienol

3 = C₂₀-alkohol7 = C₂₈-alkohol

11 = Cyclobranol

4 = C₂₂-alkohol

8 = Cycloartenol (CA)

▼ **M23***BILAG XX***Metode til bestemmelse af indholdet af voks, fedtsyremethylestere og fedtsyreethylestere ved gaskromatografi på kapillarkolonne**

1. FORMÅL

Metodens formål er bestemmelse af indholdet af voks, fedtsyremethylestere og fedtsyreethylestere i olivenolie. De enkelte vokser og alkylestere adskilles efter antallet af kulstofatomer. Metoden anbefales som værktøj til at skelne mellem olivenolie og olie af olivenpresserester og som kvalitetsparameter for ekstra jomfruolie og dermed påvisning af ulovlig blanding af ekstra jomfruolie med olie af ringere kvalitet, uanset om det er jomfruolie, bomolie eller desodoriseret olie.

2. PRINCIP

Tilsætning af egnede interne standarder til olien og adskillelse ved kromatografi på silicagelkolonne. Opsamling af den fraktion, der elueres under prøvebetingelserne (og som har lavere polaritet end triacylglycerolerne), og direkte analyse ved gaskromatografi på kapillarkolonne.

3. APPARATUR

3.1. **Erlenmeyerkolbe, 25 ml**

3.2. **Glaskolonne** til væskechromatografi, indvendig diameter 15 mm, længde 30-40 cm, med hane

3.3. **Gaskromatograf** til brug med kapillarkolonne og med et system til direkte indsprøjtning i kolonnen, bestående af følgende:

3.3.1. **Termostatstyret kolonneovn med temperaturprogrammering**

3.3.2. **Kold injektor** til direkte indsprøjtning i kolonnen

3.3.3. **En flammeioniseringsdetektor og en konverter-forstærker**

3.3.4. **Skriver/integrator** (anm. 1), der passer til konverter-forstærkeren (3.3.3), med responstid højst 1 sekund og variabel papirhastighed

Anmærkning 1: Der kan også benyttes computersystemer med direkte overførsel af data fra gaskromatografen til en pc.

3.3.5. **Kapillarkolonne af sintret kvarts (til analyse af vokser og methyl- og ethylestere)**, længde 8-12 m, indvendig diameter 0,25-0,32 mm, coatet indvendigt med væskefase (anm. 2) i en ensartet lagtykkelse på 0,10-0,30 µm

Anmærkning 2: Der er egnede væskefaser i handelen til dette formål, fx SE52 og SE54.

3.4. **Mikroinjektionssprøjte** på 10 µl, med hærdet kanyle, til direkte indsprøjtning i kolonnen

3.5. **Elektrisk vibrator**

3.6. **Rotationsfordamper**

3.7. **Muffelovn**

3.8. **Analysevægt** med en nøjagtighed på ± 0,1 mg

▼ **M23**

3.9. Sædvanligt laboratorieglassudstyr

4. REAGENSER

4.1. **Silicagel** med kornstørrelse 60-200 µm. Silicagelen anbringes i ovnen ved 500 °C i mindst fire timer. Efter afkøling tilsættes der 2 % vand beregnet på silicagelmængden. Pulveret rystes omhyggeligt, til det er ensartet, og opbevares i eksikator i mindst tolv timer inden brug.

4.2. **n-hexan** af kvalitet til kromatografering eller bestemmelse af restkoncentrationer (renheden kontrolleres)

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

4.3. **Ethylether, til kromatografering**

ADVARSEL – Meget brandfarligt og moderat giftigt. Hudirriterende. Farligt ved indånding. Kan forårsage øjenskader. Virkningerne kan indtræde med forsinkelse. Kan danne eksplosive peroxider. Dampe kan antændes. Holdes væk fra varme, gnister og åben ild. Sørg for, at flasker altid er rigtigt lukket. Sørg for god udluftning under brugen. Undgå akkumulering af dampe, og fjern alle antændelseskilder såsom elvarmeapparater og elektrisk udstyr, der ikke er lavet af ikkebrændbare materialer. Bør ikke inddampes til tørhed eller næsten tørhed. Dannelse af peroxider kan mindskes ved tilsætning af vand eller et passende reduktionsmiddel. Må ikke drikkes. Undgå indånding af dampe. Undgå længerevarende eller gentagen hudkontakt.

4.4. **n-heptan**, til kromatografering, eller **isooctan**

ADVARSEL – Brandfarligt. Farligt ved indånding. Holdes væk fra varme, gnister og åben ild. Sørg for, at flasker altid er rigtigt lukket. Sørg for god udluftning under brugen. Undgå indånding af dampe. Undgå længerevarende eller gentagen hudkontakt.

4.5. **Standardopløsning af laurylarachidat** (*anm. 3*), 0,05 % (m/v) i heptan (intern standard for voks).

Anmærkning 3: Der kan også bruges palmitylpalmitat, myristylstearat eller arachidyllaurat.

4.6. **Standardopløsning af methylheptadecanoat, 0,02 % (m/v) i heptan** (intern standard for methyl- og ethylestere)

4.7. **Sudan 1 (1-phenylazo-2-naphthol)**

▼ **M23**4.8. **Bæregas: hydrogen eller helium, ren, til gaskromatografi**

ADVARSEL

Hydrogen. Meget brandfarligt, under tryk. Holdes væk fra varme, gnister, åben ild og elektrisk udstyr, der ikke er lavet af ikkebrændbare materialer. Sørg for, at flaskens ventil er lukket, når den ikke er i brug. Benyt altid reduktionsventil. Reduktionsventilens fjeder skal udløses helt, inden ventilen på flasken åbnes. Stå ikke foran flaskens åbning, når ventilen åbnes. Sørg for god udluftning under brugen. Overfør ikke hydrogen fra en flaske til en anden. Bland ikke gasser i flasken. Sørg for, at flaskerne ikke kan vælte. Hold flasker afskærmet mod sollys og varme. Opbevares i ikkekorrosionsfremmende omgivelser. Brug ikke flasker, der er beskadiget eller mangler etiket.

Helium. Komprimeret gas under højt tryk. Gassen mindsker den mængde oxygen, der er til rådighed til vejtrækning. Hold flasken lukket. Sørg for god udluftning under brugen. Gå ikke ind i lagerrum, hvis de ikke har tilstrækkelig udluftning. Benyt altid reduktionsventil. Reduktionsventilens fjeder skal udløses helt, inden ventilen på flasken åbnes. Overfør ikke gas fra en flaske til en anden. Sørg for, at flaskerne ikke kan vælte. Stå ikke foran flaskens åbning, når ventilen åbnes. Hold flasker afskærmet mod sollys og varme. Opbevares i ikkekorrosionsfremmende omgivelser. Brug ikke flasker, der er beskadiget eller mangler etiket. Må ikke indåndes. Kun til teknisk brug.

4.9. **Hjælpegasser:**

— hydrogen, ren, til gaskromatografi

— luft, ren, til gaskromatografi.

ADVARSEL

Luft. Komprimeret gas under højt tryk. Bruges med forsigtighed, når der er brændbare stoffer til stede, da de fleste organiske forbindelser har en betydeligt lavere selvantændelsestemperatur i luft under højt tryk. Sørg for, at flaskens ventil er lukket, når den ikke er i brug. Benyt altid reduktionsventil. Reduktionsventilens fjeder skal udløses helt, inden ventilen på flasken åbnes. Stå ikke foran flaskens åbning, når ventilen åbnes. Overfør ikke gas fra en flaske til en anden. Bland ikke gasser i flasken. Sørg for, at flaskerne ikke kan vælte. Hold flasker afskærmet mod sollys og varme. Opbevares i ikkekorrosionsfremmende omgivelser. Brug ikke flasker, der er beskadiget eller mangler etiket. Luft til teknisk brug må ikke anvendes til inhalations- og respirationsapparater.

5. **FREMGANGSMÅDE**5.1. **Fremstilling af kromatografikolonnen**

15 g silicagel (4.1) opslættes i n-hexan (4.2) og hældes i kolonnen (3.2). Når kolonnematerialet har sat sig ved henstand, pakkes det yderligere ved hjælp af en el-vibrator (3.5) for at opnå større homogenitet. Der elueres med 30 ml n-hexan for at fjerne eventuelle urenheder. På analysevægten (3.8) afvejes ca. 500 mg af prøven nøjagtigt i en 25 ml kolbe (3.1), og der tilsættes en mængde intern standard (4.5) svarende til det formodede voksindhold, eksempelvis 0,1 mg laurylarachidat til olivenolie og 0,25-0,50 mg til olie af olivenpresserester og 0,05 mg methylheptadecanoat til olivenolier (4.6).

▼ **M23**

Den tilberedte prøve overføres til kromatografikolonnen ved hjælp af to portioner n-hexan (4.2) a 2 ml.

Der aftappes opløsningsmiddel, indtil væskeoverfladen står 1 mm over kolonnematerialet. Der elueres yderligere med n-hexan/ethylether (99:1) og opsamles 220 ml eluat med en hastighed på ca. 15 dråber pr. 10 sekunder. (**Denne fraktion indeholder methyl- og ethylestrener og vokserne**). (Anm. 4) (Anm. 5).

Anmærkning 4: n-hexan/ethylether-blandingen (99:1) skal friskfremstilles hver dag.

Anmærkning 5: Korrekt eluering af vokserne kan kontrolleres visuelt ved, at der til prøveopløsningen tilsættes 100 µl 1 % Sudan 1 i elueringsvæske.

Farvestoffet har en retentionstid mellem vokser og triglycerider, så når farven har nået bunden af kolonnen, skal elueringen standses, eftersom al voks da er elueret.

Den derved fremkomne fraktion inddampes i en rotationsfordamper, indtil opløsningsmidlet næsten helt er forsvundet. De sidste 2 ml fjernes ved hjælp af en svag nitrogenstrøm. Den opsamlede fraktion, der indeholder methyl- og ethylestrener, fortyndes med 2-4 ml n-heptan eller isoocetan.

5.2. Gaskromatografisk analyse

5.2.1. Indledende procedure

Kolonnen påmonteres gaskromatografen (3.3), idet den ene ende forbindes med injektionssystemet og den anden ende med detektoren. Gaskromatografen kontrolleres (gasledningerne, detektors og skrivers ydeevne, m.v.).

Hvis kolonnen ikke har været benyttet før, kan det anbefales at konditionere den. En svag gasstrøm ledes gennem kolonnen, hvorefter gaskromatografen sættes i gang. Der opvarmes gradvis til 350 °C over en periode på ca. fire timer.

Denne temperatur holdes i mindst to timer, hvorefter apparaturet indstilles til arbejdsbetingelserne (gasstrømmen indstilles, der tændes for flammen, den elektroniske skriver (3.3.4) tilsluttes, kolonneovnsens temperatur indstilles, detektoren indstilles osv.). Signalet registreres med en følsomhed på mindst det dobbelte af den, der kræves ved analysen. Basislinjen bør være lineær uden nogen form for toppe og må ikke drive.

Negativ lineær drift tyder på utætheder i kolonneforbindelserne, mens positiv drift er tegn på utilstrækkelig konditionering af kolonnen.

5.2.2. Valg af arbejdsbetingelser for vokser og methyl- og ethylestere (Anm. 6)

Arbejdsbetingelserne er normalt som følger:

— *Kolonnetemperatur:*

20 °C/min 5 °C/min

fra 80 °C (1') ————— 140 °C ————— 335 °C (20)

— *Detektortemperatur:* 350 °C

— *Indsprøjtet mængde:* 1 µl af opløsningen i (2-4 ml) n-heptan

▼ M23

- Bæregas: helium eller hydrogen med den for den valgte gas optimale lineære hastighed (se tillæg A)
- Instrumentfølsomhed: passende til opfyldelse af ovenstående krav.

Anmærkning 6: På grund af den høje sluttemperatur, tillades der en positiv drift på op til 10 % af fuldt udslag.

Disse betingelser kan ændres alt efter kolonnens og gaskromatografens karakteristika, så man opnår adskillelse af alle vokser og methyl- og ethylestere af fedtsyrer, en tilfredsstillende opløsning af toppene (se figur 2, 3 og 4) og en retentionstid for den interne standard laurylarachidat på 18 ± 3 minutter. Voksernes mest repræsentative top skal måle mindst 60 % af fuldt udslag, mens den interne standard for methyl- og ethylestrene, methylheptadecanoat, skal give fuldt udslag.

Parametrene for toppenes integration fastlægges på en sådan måde, at de relevante toppes arealer vurderes korrekt.

5.3. Udførelse af analysen

Der suges 10 µl af opløsningen op i 10 µl-mikrosprøjten, og stemplet trækkes tilbage, indtil kanylen er tom. Kanylen stikkes ind i injektionssystemet, og der indsprøjtes hurtigt efter 1-2 sekunder. Efter ca. 5 sekunder trækkes kanylen forsigtigt ud.

Registreringen fortsættes, indtil alle vokser eller stigmastadiener er helt elueret, afhængigt af, hvilken fraktion der analyseres.

Basislinjen skal hele tiden opfylde de fastsatte betingelser.

5.4. Identifikation af toppene

Toppene identificeres ud fra retentionstiderne, idet de sammenlignes med blandinger af vokser med kendte retentionstider, der er analyseret under samme betingelser. Alkylestrene identificeres ud fra blandinger af methyl- og ethylestre af de vigtigste fedtsyrer i olivenolie (palmitinsyre og oliesyre).

Figur 1 viser et kromatogram af vokser fra jomfruolie. Figur 2 og 3 viser kromatogrammer af to ekstra jomfruolier fra detailhandelen, den ene indeholdende methyl- og ethylestre, den anden ikke. Figur 4 viser kromatogrammerne af en ekstra jomfruolie af bedste kvalitet og af samme olie, hvortil der er tilsat 20 % desodoriseret olie.

5.5. Kvantitativ analyse af vokserne

Arealerne af toppene for den interne standard laurylarachidat og for de alifatiske C₄₀- til C₄₆- estere bestemmes ved hjælp af integratoren.

Det samlede voksindhold bestemmes som summen af de enkelte vokser i mg/kg fedtstof efter formlen:

$$\text{vokser, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ **M23**

hvor:

A_x = arealet af toppen for den enkelte ester i computerenheder

A_s = arealet af toppen for den interne standard laurylarachidat i computerenheder

m_s = massen af tilsat intern standard laurylarachidat i milligram

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

5.5.1. *Kvantitativ analyse af methyl- og ethylestere*

Arealerne af toppene for den interne standard methylheptadecanoat, methylestrene af C₁₆- og C₁₈-fedtsyrerne og ethylestrene af C₁₆- og C₁₈-fedtsyrerne bestemmes ved hjælp af integratoren.

Indholdet af den enkelte alkylester bestemmes i mg/kg fedtstof efter formlen:

$$\text{Ester, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

hvor:

A_x = arealet af toppen for den enkelte C₁₆- og C₁₈-ester i computerenheder

A_s = arealet af toppen for den interne standard methylheptadecanoat i computerenheder

m_s = massen af tilsat intern standard methylheptadecanoat i milligram

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

6. **ANGIVELSE AF RESULTATER**

Summen af indholdet af de forskellige C₄₀- til C₄₆-vokser (*Anm. 7*) angives i mg pr. kg fedtstof (ppm).

Summen af indholdet af henholdsvis C₁₆- til C₁₈-methylestere og -ethylestere angives samt de to summer tilsammen.

Resultaterne angives i nærmeste hele mg/kg.

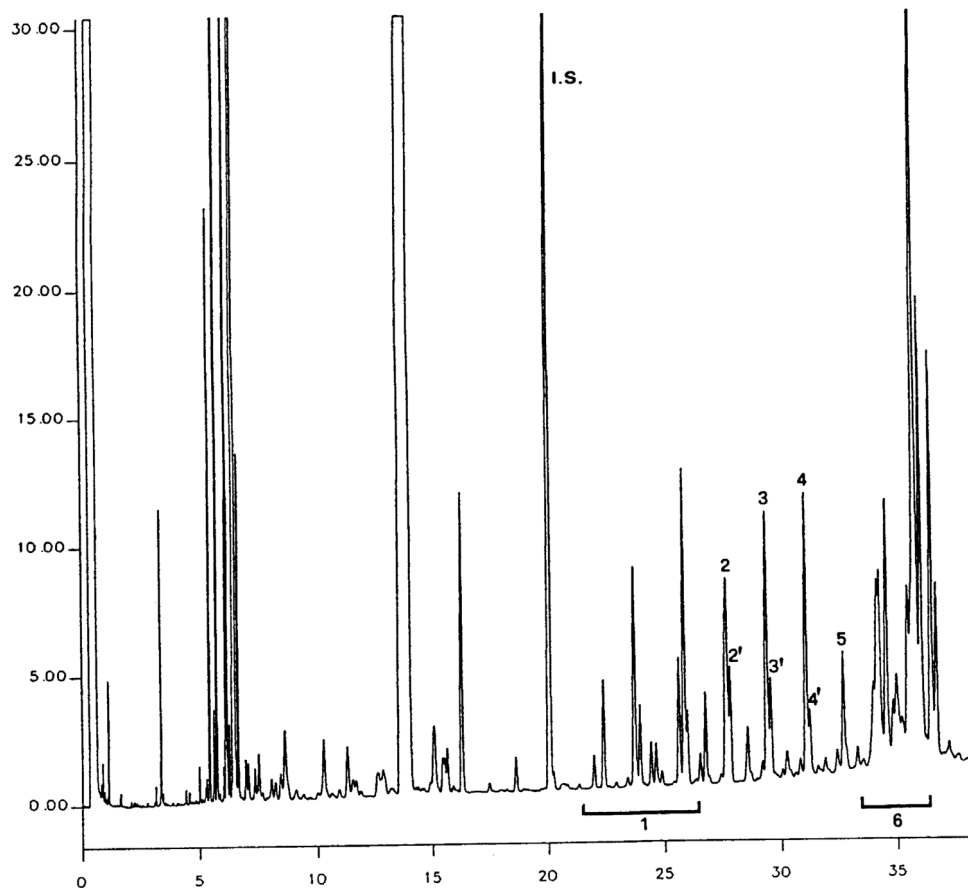
Anmærkning 7: De bestanddele, der skal bestemmes kvantitativt, er dem med et lige antal kulstofatomer blandt C₄₀- til C₄₆-estrene, jf. eksemplet på et kromatogram af vokser i olivenolie i nedenstående figur. Hvis C₄₆-esteren giver en dobbelt top, tilrådes det med henblik på identifikation at analysere voksfraktionen fra en olie af olivenpresse-rester, hvor C₄₆-toppen tydeligt kan skelnes, da den er langt den største.

Forholdet mellem ethylestere og methylestere angives.

▼ M23

Figur 1

Eksempel på et gaskromatogram af voksfraktionen fra en olivenolie ⁽¹⁾



Signaturer:

Toppe med en retentionstid mellem 5 og 8 minutter større end fedtsyremethylestere og -ethylestere.

I.S. = laurylarachidat

1 = diterpenestere

2+2' = C₄₀-estere

3+3' = C₄₂-estere

4+4' = C₄₄-estere

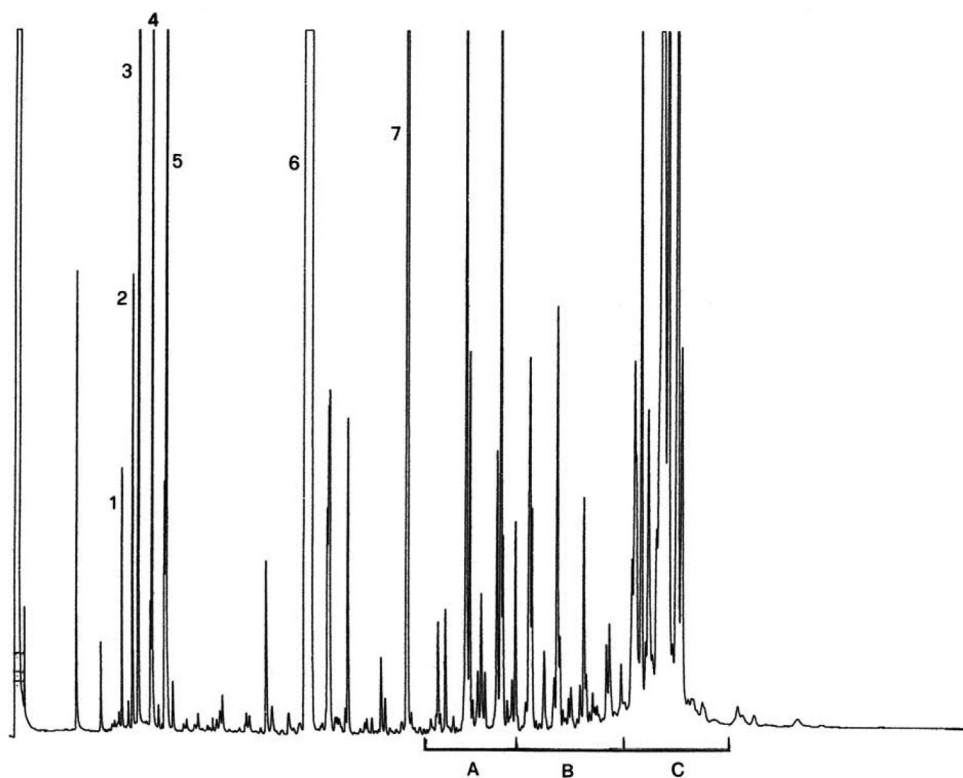
5 = C₄₆-estere

6 = sterolestere og triterpenalkoholer.

⁽¹⁾ Efter eluering af sterolestrene må kromatogrammet ikke have nogen betydende toppe (triacylglyceroler).

▼ **M23**

Figur 2

Methylestere, ethylestere og vokser i en jomfruolie

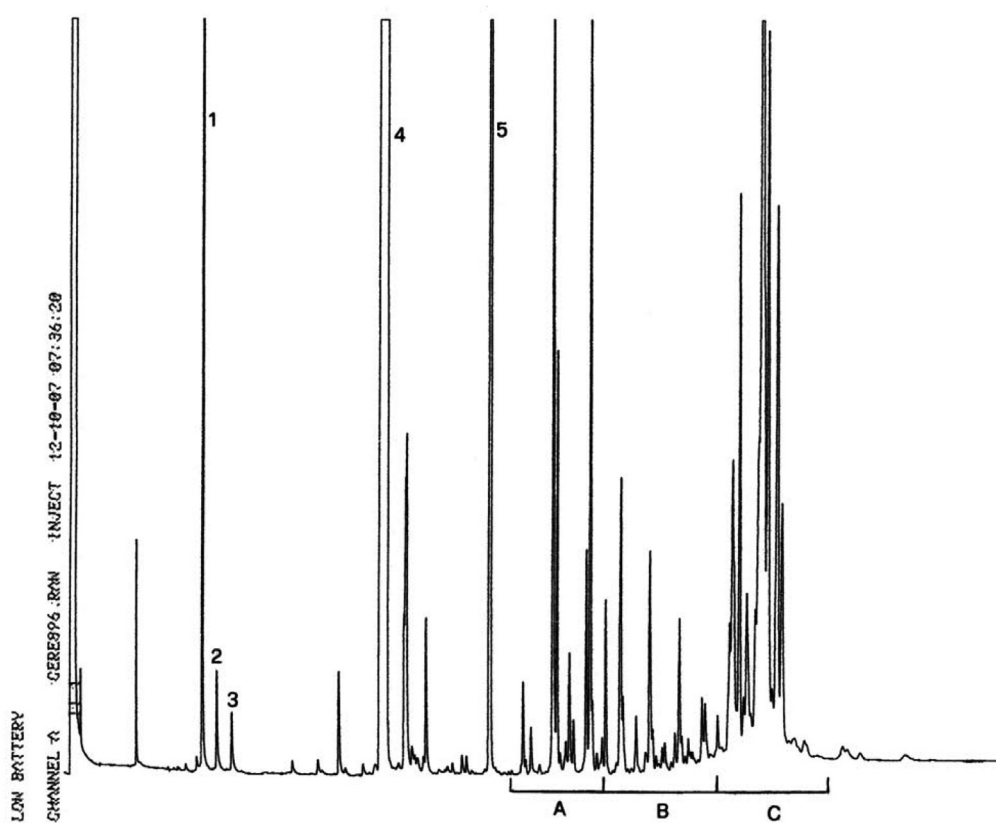
Signaturer:

- 1 - methyl-C₁₆
- 2 - ethyl-C₁₆
- 3 - methylheptadecanoat, I.S.
- 4 - methyl-C₁₈
- 5 - ethyl-C₁₈
- 6 - Squalene
- 7 - laurylarachidat, I.S.
- A - diterpenestere
- B - vokser
- C - sterolestere og triterpenalkoholer

▼M23

Figur 3

Methylestere, ethylestere og vokser i en ekstra jomfruolie



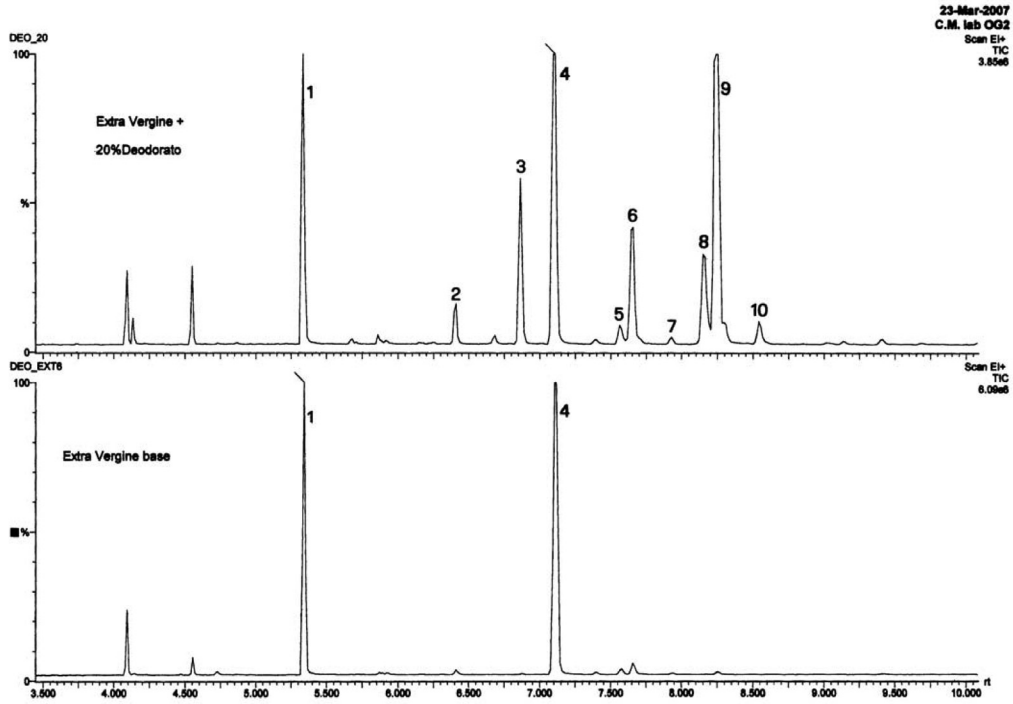
Signaturer:

- 1 – methylheptadecanoat, I.S.
- 2 – methyl-C₁₈
- 3 – ethyl-C₁₈
- 4 – squalen
- 5 – laurylarachidat, I.S.
- A – diterpenestere
- B – vokser
- C – sterolestere og triterpenalkoholer

▼ M23

Figur 4

Udsnit af kromatogrammer af en ekstra jomfruolie og af samme olie, hvortil der er tilsat desodoriseret olie



Signaturer:

- 1 – methylmyristat, I.S.
- 2 – methylpalmitat
- 3 – ethylpalmitat
- 4 – methylheptadecanoat, I.S.
- 5 – methylinoleat
- 6 – methyloleat
- 7 – methylstearat
- 8 – ethyllinoleat
- 9 – ethyloleat
- 10 – ethylsteara

▼ M23*Tillæg A***Bestemmelse af gassens lineære hastighed**

Der indsprøjtes 1-3 µl methan (eller propan) i gaskromatografen, efter at den er indstillet til normale arbejdsbetingelser. Den tid, som det tager gassen at strømme gennem kolonnen fra det øjeblik, den indsprøjtes, til toppen viser sig, måles (tM).

Den lineære hastighed i cm/s er givet ved L/tM , hvor L er søjlens længde i cm, og tM er den målte tid i sekunder.

▼ M28

BILAG XXI

Resultaterne af overensstemmelseskontroller, der er udført på olivenolie, jf. artikel 8, stk. 2

				Mærkning						Kemiske parametre			Organoleptiske kendetegn ⁽⁴⁾			Endelig konklusion	
Prøve	Kategori	Oprindelsesland	Kontrolsted ⁽¹⁾	Betegnelsen ifølge forskrifterne	Oprindelsesbetegnelse	Opbevaringsforskrifter	Ukorrekt information	Læselighed	O/IO ⁽³⁾	Parametre uden for grænseværdierne J/N	I bekræftede fald, hvilke? ⁽²⁾	O/IO ⁽³⁾	Medianfor mangler	Medianfor lugt og smag	O/IO ⁽³⁾	Indgreb	Sanktion

⁽¹⁾ I indre marked (fabrik, tapperi, detailhandel), eksport, import

⁽²⁾ Alle kendetegnene for olivenolie i bilag I skal have en kode

⁽³⁾ Overensstemmende/ikke overensstemmende

⁽⁴⁾ Kræves ikke for olivenolie og olie af olivenpresserester