I

(Retsakter hvis offentliggørelse er obligatorisk)

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

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Traktaten om Oprettelse af Det Europæiske Økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning nr. 136/66/EØF af 22. september 1966 om oprettelse af en fælles markedsordning for fedtstoffer (1), senest ændret ved forordning (EØF) nr. 3577/90 (2), særlig artikel 35a, og

ud fra følgende betragtninger:

I bilaget til forordning nr. 136/66/EØF er der fastsat betegnelser for og definitioner på olivenolie og olie af olivenpresserester, der afsættes i de enkelte medlemsstater, i samhandelen mellem medlemsstaterne og i samhandelen mellem medlemsstaterne og tredjelande;

for at kunne skelne mellem de forskellige typer olie er det nødvendigt at definere de fysisk-kemiske kendetegn for hver type samt de organoleptiske kendetegn for jomfruolie, således at produkternes renhed og kvalitet sikres uden at dette berører andre eksisterende bestemmelser på området;

kendetegnene for de forskellige typer olie bør fastlægges ensartet for hele Fællesskabet; med henblik herpå bør der fastlægges EF-metoder for kemisk analyse og orgenoleptisk vurdering; i en overgangsperiode bør medlemsstaterne dog kunne anvende andre metoder, idet det dog skal fastsættes, at det er resultatet af den fælles metode, der gælder i tilfælde af uoverensstemmelse;

definitionen af de fysisk-kemiske kendetegn for olivenolie og analysemetoder indebærer, at de supplerende bestemmelser til kapitel 15 i Den Kombinerede Nomenklatur skal tilpasses;

som led i metoden til bedømmelse af jomfruolies organoleptiske kendetegn skal der oprettes paneler af udvalgte og øvede smagsdommere; der bør afsættes den fornødne tid til etablering af en sådan struktur; i betragtning af de vanskeligheder, som visse medlemsstater vil få med at oprette panelerne, bør det tillades disse medlemsstater at benytte de i andre medlemsstater eksisterende paneler;

for at ordningen med importafgift på olivenpresserester kan fungere efter hensigten bør der fastlægges en fælles metode til bestemmelse af olieindholdet i disse produkter;

for ikke at påføre handelen skade, bør det fastsættes, at det i en begrænset periode er tilladt at afsætte olie aftappet før denne forordnings ikrafttræden;

Kommissionens forordning (EØF) nr. 1058/77 (3), senest ændret ved forordning (EØF) nr. 1858/88 (4), bør ophæves;

Forvaltningskomitéen for Fedtstoffer har ikke afgivet udtalelse inden for den af formanden fastsatte frist —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

1. Som jomfruolie (KN-kode 1509 10 90) efter punkt 1, litra a), b) og c), i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF betragtes olie, hvis respektive kendetegn er i overensstemmelse med kendetegnene i punkt 1, 2 og 3 i bilag I til nærværende forordning.

2. Som bomolie (KN-kode 1509 10 10) efter punkt 1, litra d), 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.

3. Som raffineret olivenolie (KN-kode 1509 90 00) efter punkt 2 i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF betragtes olie, hvis kendetegn er i overensstemmelse med kendetegnene i punkt 5 i bilag I til næværende forordning.

(1) EFT nr. 172 af 30. 9. 1966, s. 3025/66.
(2) EFT nr. L 353 af 17. 12. 1990, s. 23.
(3) EFT nr. L 128 af 24. 5. 1977, s. 6.
(4) EFT nr. L 166 af 1. 7. 1988, s. 10.

4. Som olivenolie (KN-kode 1509 90 00) efter punkt 3 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.

5. Som rå olie af olivenpresserester (KN-kode 1510 00 10) efter punkt 4 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.

6. Som raffineret olie af olivenpresserester (KN-kode 1510 00 90) efter punkt 5 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.

7. Som olie af olivenpresserester (KN-kode 1510 00 90) efter punkt 6 i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF betragtes olie, hvis kendetegn er i overensstemmelse med kendetegnene i punkt 9 i bilag I til nærværende forordning.

Artikel 2

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

— til bestemmelse af indholdet af frie fedtsyrer, beregnet som oliesyre, metoden i bilag II

— til bestemmelse af peroxidtallet, metoden i bilag III

— til bestemmlese af indholdet af alfatiske alkoholer, metoden i bilag IV

— til bestemmelse af indholdet af steroler, metoden i bilag V

— til bestemmelse af indholdet af erytrodiol og uvaol, metoden i bilag VI

— til bestemmelse af indholdet af mættede fedtsyrer i 2-stillingen i triglycerider, metoden i bilag VII

— til bestemmelse af indholdet af trilinolcin, metoden i bilag VIII

— til den spektrofotometriske undersøgelse, metoden i bilag IX

— til bestemmelse af fedtsyrernes sammensætning, metoden i bilag X A og X B

— til bestemmelse af indholdet af flygtige halogenerede opløsningsmidler, metoden i bilag XI

— til bestemmelse af jomfruolies organoleptiske kendetegn, metoden i bilag XII, anvendt som omhandlet i stk. 2

— til bevis for raffinering, metoden i bilag XIII.

2. Analytikeren — eventuelt bistået af eksperter — bedømmer de organoleptiske kendetegn efter proceduren beskrevet i det i bilag XII omhandlede smageskema. Hvis de gennem analysen fremkomne kendetegn afviger fra dem, der fremgår af produktets betegnelse, undersøges prøven af et smagspanel som omhandlet i bilag XII.

Den nye analyse foretages af panelet i overensstemmelse med nævnte bestemmelser.

Når det gælder bedømmelsen af de organoleptiske kendetegn i forbindelse med foranstaltningerne under interventionsordningen, foretages den af smagspanelet i henhold til bilag XII.

Artikel 3

Indførelsen af de i artikel 2 fastsatte analysemetoder udelukker ikke, at medlemsstaterne indtil den 31. oktober 1992 kan anvende andre afprøvede og videnskabeligt anerkendte metoder, hvis den frie bevægelse af produkter, som ifølge EF-metoderne opfylder de gældende bestemmelser, ikke hindres herved. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen disse andre metoder, inden de anvender dem.

Hvis en af de andre metoder giver et andet resultat end det, der følger af EF-metoden, fastholdes resultatet fra EF-metoden.

Artikel 4

1. Med henblik på vurderingen af de organoleptiske egenskaber opretter medlemsstaterne paneler af smagsdommere, der udvælges og trænes efter reglerne i den i bilag XII beskrevne metode.

2. Hvis en medlemsstat har vanskeligheder med at oprette et panel på sit område, kan den gøre brug af et panel i en anden medlemsstat.

Artikel 5

Supplerende bestemmelse nr. 2, 3 og 4 til kapitel 15 i Den Kombinerede Nomenklatur erstattes af supplerende bestemmelse nr. 2, 3 og 4 i bilag XIV til denne forordning.

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.

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

Artikel 7

EF-bestemmelserne vedrørende forekomsten af andre uønskede stoffer end dem, der er omhandlet i bilag XI, finder anvendelse.

Artikel 8

1. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen, hvilke foranstaltninger de træffer til anvendelse af denne forordning.

2. Medlemsstaterne meddeler Kommissionen i begyndelsen af hvert halvår en oversigt over analyseresultaterne i forbindelse med de bestemmelser, der er foretaget i løbet af det foregående halvår.

Resultaterne gennemgås af Forvaltningskomitéen for Fedtstoffer efter proceduren i artikel 39 i forordning nr. 136/66/EØF.

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 1. januar 1992, undtagen i forbindelse med interventionsforanstaltninger.

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.

Udfærdiget i Bruxelles, den 11. juli 1991.

På Kommissionens vegne
Ray MAC SHARRY
Medlem af Kommissionen

BILAG

Resumé

		Side
Bilag I:	Karakteristika ved olivenolie	4
Bilag II:	Bestemmelse af indholdet af frie fedtsyrer	6
Bilag III:	Bestemmelse af peroxidtallet	8
Bilag IV:	Bestemmelse af indholdet af alifatiske alkoholer ved gaskromatografi på kapillarsøjle	10
Bilag V:	Bestemmelse af sammensætningen og indholdet af steroler ved gaskromatografi på kapillarsøjle	15
Bilag VI:	Bestemmelse af erythrodiol og uvaol	23
Bilag VII:	Bestemmelse af fedtsyrer i 2-positionen i triglycerider fra olier og fedtstoffer	25
Bilag VIII:	Bestemmelse af indholdet af trilinolein	29
Bilag IX:	Spektrofotometrisk undersøgelse ved ultraviolet lys	33
Bilag XA:	Gaskromatografering af fedtsyremethylestere	36
Bilag XB:	Fremstilling af fedtsyremethylestere	44
Bilag XI:	Bestemmelse af indholdet af flygtige halogenerede opløsningsmidler i olivenolie	48
Bilag XII:	Organoleptisk vurdering af jomfruolie	49
Bilag XIII:	Raffineringsbevis	75
Bilag XIV:	Supplerende bestemmelse nr. 2, 3 og 4 til kapitel 15 i Den Kombinerede Nomenklatur	77
Bilag XV:	Olieindhold i presserester af oliven	80
Bilag XVI:	Bestemmelse af iodtal	82

BILAG I

KARAKTERISTIKA VED OLIVENOLIE (1)

Type	Surhedsgrad %	Peroxidtal meq O_2/kg	Halogenerede opløsningsmidler (2) mg/kg	Alifatiske alkoholer mg/kg	Mættede syrer i 2-stillingen i triglycerid %	Erytrodiol + uvaol %	Trilinolein %	Kolesterol %	Brassicasterol %	Campesterol %	Stigmasterol %	β-sitosterol % (3)	Δ-7-stigmastenol %	Steroler i alt mg/kg
1. Jomfruolie ekstra	M 1,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
2. Jomfruolie	M 2,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
3. Jomfruolie almindelig	M 3,3	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
4. Bomolie	> 3,3	> 20	> 0,20	M 400	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 1 000
5. Olivenolie raffineret	M 0,5	M 10	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
6. Olivenolie	M 1,5	M 15	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
7. Rå olivenolie af presserester	m 2,0	—	—	—	M 1,8	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 2 500
8. Raffineret olivenolie af presserester	M 0,5	M 10	M 0,20	—	M 2,0	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800
9. Olivenolie af presserester	M 1,5	M 15	M 0,20	—	M 2,0	> 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800

M = maximum, m = minimum.

(1) En olie deklasseres, hvis blot en enkelt egenskab ligger uden for de fastsatte grænser.

(2) Total maksimalgrænseværdi for detektorforbindelser pr. detektor ved elektronfangst. For de enkelte påviste bestanddele er den maksimale græseværdi 0,10 mg/kg.

(3) Δ-5,23-stigmastadienol + Clerosterol + Sitosterol + Sitostanol + Δ-5-avenasterol + Δ-5,24-stigmastadienol.

Type	Fedtsyresammensætning						K_{232}	K_{270}	K_{270} med aluminiumoxyd (1)	ΔK	Panel-bedømmelse
	Myristin %	Linolen %	Arachin %	Eicosan %	Behen %	Lignocerin %					
1. Jomfruolie ekstra	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,40	M 0,20	M 0,10	M 0,01	⩾6,5
2. Jomfruolie	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	⩾5,5
3. Jomfruolie almindelig	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	⩾3,5
4. Bomolie	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,70	> 0,25	M 0,11	—	<3,5
5. Olivenolie raffineret	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,40	M 1,20	—	M 0,16	—
6. Olivenolie	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,30	M 1,00	—	M 0,13	—
7. Rå olivenolie af presserester	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	—	—	—	—	—
8. Raffineret olivenolie af presserester	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 5,50	M 2,50	—	M 0,25	—
9. Olivenolie af presserester	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 5,30	M 2,00	—	M 0,20	—

(1) Hvis olier med surhedsgrad på over 3,3 % efter passage af aluminiumoxyd viser K_{270} på over 0,11, foretages den i bilag XIII onhandlede raffineringsprøve. Med henblik på at fastslå renheden bestemmes K_{270} på ny efter behandling med aluminiumoxyd, når K_{270} overstiger grænsen for den pågældende kategori.

BILAG II

BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF FRIE FEDTSYRER

1. FORMÅL

Bestemmelse af frie fedtsyrer i olivenolie. Indholdet af frie fedtsyrer udtrykkes ved det vedtægtsmæssigt beregnede syreindhold.

1.1. **Princip**

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

1.2. **Reagenser**

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

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

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

Nøjagtigt på anvendelsestidspunktet neutraliseres med en opløsning af kaliumhydroxid (1.2.2) ved tilstedeværelse af 0,3 ml phenolphtalein-opløsning (1.2.3) pr. 100 ml blanding.

Note: 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.

1.2.2. Indstillet opløsning af kaliumhydroxid i ethanol, c(KOH) ca. 0,1 mol/l eller om nødvendigt c(KOH) ca. 0,5 mol/l.

Den nøjagtige koncentration af kaliumhydroxid-opløsningen i ethanol skal være kendt og verificeres umiddelbart 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.

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

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

1.2.3. Phenolphtalein, opløsning med 10 g/l i 95—96 % (v/v) ethanol, eller alkaliblåt (i tilfælde af stærkt farvede fedtstoffer), opløsning med 20 g/l i 95—96 % (v/v) ethanol.

1.3. **Apparatur**

Sædvanligt laboratorieudstyr, herunder:

1.3.1. Analysevægt.

1.3.2. 250 ml Erlenmeyer-kolbe.

1.3.3. 10 ml burette med 0,05 ml inddelinger.

1.4. **Fremgangsmåde**

1.4.1. Forberedelse af analyseprøve

Analyseprøven forberedes i overensstemmelse med NF T 60—200. (På prøven som den er, hvis det samlede indhold af vand og urenheder ikke overstiger 1 %, ellers på en filtreret prøve). Bestemmelsen foretages på den filtrerede prøve. Hvis det samlede indhold af vand og urenheder er under 1 %, foretages bestemmelsen på den ubehandlede prøve.

1.4.2. Prøveudtagning

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

Antaget syreindhold vægtprocent	Prøvens masse i g	Prøven afvejes med en nøjagtighed i g på
< 1	20	0,05
1— 4	10	0,02
4—15	2,5	0,01
15—75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Prøven afvejes i Erlenmeyer-kolben (1.3.2).

1.4.3. Bestemmelse

Prøven (1.4.2) opløses i 50 — 150 ml af den på forhånd neutraliserede blanding af diethylether/ethanol (1.2.1).

Under omrøring titreres med kaliumhydroxidopløsning, 0,1 mol/l (1.2.2) (se note 2), indtil indikatoren slår om (den rosa farve af phenolphtalein skal holde sig i mindst 10 sek.).

Note 1: Den indstillede opløsning af kaliumhydroxid i ethanol (1.2.2) kan erstattes af en vandig opløsning af kaliumhydroxid eller natriumhydroxid, når den tilførte vandmængde ikke medfører faseadskillelse.

Note 2: Hvis den nødvendige mængde 0,1 mol/l kaliumhydroxidopløsning overstiger 10 ml, anvendes i stedet en opløsning på 0,5 mol/l.

Note 3: Bliver opløsningen uklar under titreringen, tilsættes så meget opløsningsmiddelblanding (1.2.1), at opløsningen bliver klar.

1.5. **Angivelse af syreindholdet i % oliesyre**

$$\text{Syreindholdet, udtrykt som vægtprocent} = V \times c \times \frac{M}{1\,000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

hvor:

V = rumfanget i ml af den forbrugte kaliumhydroxidopløsning

c = den nøjagtige koncentration i mol/l af den anvendte kaliumhydroxidopløsning

M = den molvægt i g/mol af syren, der er valgt til angivelse af resultatet ($M_{oliesyre}$ = 282 g/mol)

m = analyseprøvens vægt i gram.

Som resultat anvendes det aritmetiske gennemsnit af de to bestemmelser.

BILAG III

BESTEMMELSE AF PEROXIDTALLET

1. OMRÅDE

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

2. ANVENDELSESOMRÅDE

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

3. DEFINITION

Peroxidtallet 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. Analyseren chloroform, befriet for oxygen ved gennembobling med ren, tør inert gas.

6.2. Analyseren 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.

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 perioxidtal (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

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

$$P.V. = \frac{V \times T \times 1\,000}{m}$$

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.

BILAG IV

BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF ALIFATISKE ALKOHOLER VED GASKROMATOGRAFI PÅ KAPILLARSØJLE

1. OMRÅDE

Metoden beskriver en fremgangsmåde til at bestemme indholdet af de enkelte alifatiske alkoholer og det samlede indhold af alifatiske alkoholer i fedtstoffer.

2. METODENS PRINCIP

Fedtstoffer, tilsat 1-eicosanol som intern standard, forsæbes med kaliumhydroxid i ethanolopløsning, hvorefter de ikke-forsæbelige stoffer ekstraheres med diethylether.

Alkoholfraktionen separeres fra ekstrakten af ikke-forsæbelige stoffer ved kromatografi på basiske kiselgelplader. 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 refluxsvaler med samlinger med glasslib.

3.2. 500 ml skilletragte.

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 µl og 500 µl mikrosprøjter.

3.7. En cylindrisk filtertragt med et G3 porøst septum (porøsitet 15—40 µm), med en diameter på ca. 2 cm og en dybde på ca. 5 cm, med en befæstelsesdel, der er egnet til filtrering under vakuum, og en samlingsdel med et 12/21 udvendig konisk glasslib.

3.8. En 50 ml konisk vakuumkolbe med et 12/21 invendig konisk glasslib, som filtertragten (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, forsynet med et spaltningssystem, der består af:

3.10.1. Et termostatkammer til søjler, som kan opretholde den ønskede temperatur med en nøjagtighed på ± 1° C.

3.10.2. En inddampningsenhed med temperaturindstilling, med et fordampningselement af silanglas.

3.10.3. En flammeioniserings-detektor og en omformer-forstærker.

3.10.4. En integrerende skriver, der er egnet til brug med omformer-forstrækeren (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 overtrukket 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.

4. REAGENSER

4.1. Kaliumhydroxid, ca. 2 N, i ethanolopløsning. 130 g kaliumhydroxid (minimum titer 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, analyseren.

4.3. Vandfrit natriumsulfat, analyserent.

4.4. Glasplader overtrukket med kiselgel, uden fluorescens-indikator, 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 (5.2.2).

4.7. Acetone, til kromatografi (5.2.2).

4.8. Hexan, til kromatografi (5.2.2).

4.9. Diethylether, til kromatografi (5.2.2).

4.10. Chloroform, analyseren.

4.11. Referenceopløsning til tyndtlagskromatografi: En 5 % opløsning af en blanding af alkoholer fra C_{20} til C_{28} i chloroform.

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. Testopløsninger af trimethylsilylethere (TMSE) af de alifatiske alkoholer fra C_{20} til C_{28}, 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, gaskromatografiren.

4.19. Hjælpegasser:

— Hydrogen, gaskromatografiren

— Luft, gaskromatografiren.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. Forberedelse af de ikke-forsæbelige stoffer

5.1.1. Et rumfang 0,1 % 1-eicosanolopløsning i chloroform (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 olivenolier 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.

5.1.2. 50 ml 2 N opløsning af kaliumhydroxid i ethanol tilsættes, refluxsvaleren påsættes, og væsken opvarmes til svag kogning på vandbad under vedvarende, kraftig omrøring, 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. Kolbens indhold overføres kvantitativt til en 500 ml skilletragt, idet der skylles flere gange med destilleret vand, ialt ca. 50 ml. Ca. 80 ml diethylether tilsættes, tragten rystes kraftigt i ca. 30 sekunder og får lov til at henstå (note 1).

Den nederste, 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: Eventuel emulsion kan ødelægges ved tilsætning af små mængder ethyl- eller methylalkohol ved hjælp af en spray.

5.1.4. Etherekstrakterne samles i en enkelt skilletragt og vaskes med destilleret vand (50 ml ad gangen), indtil vaskevandet giver en neutral reaktion.

Når vaskevandet er fjernet, tørres ekstrakterne med vandfrit natriumsulfat og filtreres over vandfrit natriumsulfat ned i en på forhånd vejet 250 ml kolbe, idet tragt og filter vaskes med små mængder diethylether.

5.1.5. Etheren 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 så efter afkøling i en ekssikkator.

5.2. **Separation af alkoholfraktionen**

5.2.1. Forberedelse af de basiske plader. Kiselgelpladerne (4.4) nedsænkes fuldstændig i 0,2 N opløsningen af kaliumhydroxid i ethanol (4.5) i 10 sekunder. Derefter får de lov at tørre i et stinkskab i 2 timer og sættes til sidst i en ovn ved 100° C i 1 time.

Pladerne tages ud af ovnen og opbevares i en calciumchlorid-ekssikkator, 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 aluminiuoxid. På denne måde holdes alle sure forbindelser (fede syrer og andre) tilbage på basislinien, og de alifatiske og terpene alkoholers bånd er klart adskilt fra sterolbåndet.

5.2.2. En 95:5 (v/v) benzen/acetoneblanding anbringes i kromatografikammeret til en højde på ca. 1 cm. Som et alternativ kan en 65:35 (v/v) hexan/diethyletherblanding bruges. Kammeret lukkes med det dertil passende dæksel og efterlades således i ca. en halv time, så at der opnås ligevægt mellem væske og damp. Strimler af filtrerpapir, 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 3: Kromatografiblandingen bør udskiftes for hver test for at opnå fuldstændig reproducerbare elueringsbetingelser.

5.2.3. Der tilberedes en ca. 5 % opløsning af de ikke-forsæbelige stoffer (5.1.5) i chloroform. Med 100 µl mikrosprøjten afsættes med 0,3 ml af denne opløsning på en kromatografiplade (5.2.1), ca. 2 cm fra den ene ende, en streg, som er så tynd og ensartet som muligt. På linie med strengen placeres 2—3 µl af alkoholreferenceopløsningen (4.11) i den ene ende af pladen, så de alifatiske alkoholers bånd kan identificeres efter eluering.

5.2.4. Pladen anbringes i kromatografikammeret, der er forberedt som angivet i 5.2.2. Temperaturen bør holdes mellem 15 og 20° C. Kammeret lukkes straks med dækslet, og det får lov til at eluere, indtil opløsningsmidlets forkant når ca. 1 cm fra pladens øverste kant. Derpå fjernes pladen fra kromatografi-kammeret, og man lader opløsningsmidlet fordampe i en strøm af varm luft eller ved at lade pladen stå en kort tid i stinkskab.

5.2.5. Pladen sprøjtes let og ensartet med 2,7-dichlorfluoresceinopløsningen. Når pladen undersøges under ultraviolet lys, identificeres de alifatiske alkoholers bånd ved at bringes på linie med den plet, der er opnået med referenceopløsningen, og alle de alifatiske alkoholers bånd, tillige med det bånd, der ligger umiddelbart ovenfor, og som svarer til de triterpene alkoholer, markeres med en sort blyant.

Note 4: Instruktionen om at samle alle de alifatiske alkoholers bånd og de triterpene alkoholers bånd skyldes, at under denne metodes betingelser er betydelige mængder af alifatiske alkoholer inkluderet i de triterpene alkoholers bånd.

5.2.6. Med en metalspatel skraber man kiselgelen af i det markerede område. Det fint pulveriserede materiale, der er fjernet, placeres i filtertragten (3.7). 10 ml varm chloroform tilsættes, man blander omhyggeligt med metalspatelen og filtrerer under vakuum, filtratet opsamles i den koniske kolbe (3.8), der er forbundet med filtertragten.

Det tilbageholdte materiale i tragten vaskes tre gange med diethylether (ca. 10 ml hver gang), idet filtratet samles i den samme koniske kolbe, der er forbundet med filtertragten. Filtratet inddampes til et rumfang af ca. 4—5 ml. Den tilbageværende opløsning overføres til det på forhånd vejede 10 ml prøverør (3.9), det inddampes til tørhed med let opvarmning i en blød strøm af nitrogen, der fyldes atter op med nogle få dråber acetone, det inddampes igen til tørhed, røret placeres i en ovn ved 105° C i ca. 10 minutter, derefter lader man det svale af i en ekssikkator og vejer det.

Den rest, der findes i prøverøret, består af alkoholfraktionen.

5.3. **Forberedelse af trimethylsilyletherne**

5.3.1. Til prøverøret, der indeholder alkoholfraktionen, sættes silyleringsreagenset, der består af en 9:3:1 (v/v/v) blanding af pyridin/hexamethyl-disilazan/trimethyl-chlorsilan (note 5), i forholdet 50 µl for hvert milligram alkohol, idet enhver optagelse af fugt undgås (note 6).

Note 5: Brugsfærdige opløsninger kan fås i handelen. Man kan også få andre silyleringsreagenser som f.eks. bis-trimethylsilyltrifluor-acetamid + 1 % trimethyl-chlorsilan, som skal fortyndes med et lige så stort rumfang vandfrit pyridin.

5.3.2. Prøverøret tilproppes, rystes omhyggeligt (uden at vende bunden i vejret på det), indtil alkoholerne er fuldstændig opløst. Man lader det stå i mindst 15 minutter ved stuetemperatur og centrifugerer det så i nogle få minutter. Den klare opløsning er parat til gaskromatografisk analyse.

Note 6: Den lette opalisering, 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 reagensen. Hvis det forekommer, må prøven gentages.

5.4. **Gaskromatografisk analyse**

5.4.1. Forberedende operationer, pakning af søjlen

5.4.1.1. Søjlen monteres i gaskromatografen, idet indløbsenden forbindes med fordamperen, der står i forbindelse med spaltningssystemet, og udløbsenden forbindes med detektoren.

Man foretager en generel kontrol af gaskromatografienheden (lækager fra gaskredsløbene, detektorens effektivitet, spaltningssystemets og registreringssystemets 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 20° C over driftstemperaturen (note 7). Denne temperatur opretholdes i mindst 2 timer, derefter sættes hele systemet i driftstilstand (justering af gasstrømme og spaltning, 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. Basisliniens forløb skal være lige, uden toppe af nogen art, og den må ikke glide.

Negativ glidning af en lige linie tyder på lækage fra søjlens forbindelser, positiv glidning 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. De anbefalede driftsbetingelser er som følger:

— søjletemperatur: indledende isoterm i 8 minutter ved 180° C, derefter programmeret til 5° /minut op til 260° C, og så 15 minutter ved 260° C

— fordampertemperatur: 280° C

— detektortemperatur: 290° C

— bæregassens lineære hastighed: helium 20—35 cm/s, hydrogen 30—50 cm/s

— spaltingsforhold: fra 1:50 til 1:100

— instrumentets følsomhed: fra 4 til 16 gange den minimale dæmpning

— registreringsfølsomhed: 1—2 mV fuld skala

— papirhastighed: 30—60 cm/time

— mængde stof injiceret: 0,5—1 µl TMSE-opløsning.

Disse betingelser kan varieres i lyset af søjlens og gaskromatografens egenskaber, så man opnår kromatogrammer, der opfylder følgende krav:

— retentionstiden for C_{26} alkohol bør være 18 ± 5 minutter

— toppen for C_{22} alkohol bør 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 toppe må fastsættes sådan, at de giver en korrekt vurdering af de undersøgte toparealer.

5.4.3. Analytisk fremgangsmåde

5.4.3.1. Med 10 µl mikrosprøjten optages 1 µl hexan, derefter suges først 0,5 µl luft og derefter 0,5—1 µl af prøveopløsningen op. Stemplet trækkes højere op, så kanylen tømmes. Kanylen trykkes gennem injektionsenhedens membran, og efter 1—2 sekunder injiceres hurtigt, derefter fjernes kanylen langsomt efter ca. 5 sekunder.

5.4.3.2. Optegnelsen fortsættes, indtil de tilstedeværende alkoholers TMSE er fuldstændig elueret.

Basislinien skal til stadighed opfylde kravene. (5.4.1.2).

5.4.4. Identifikation af toppene

De enkelte toppe identificeres på basis af retentionstiderne og ved sammenligning med blandinger af alkohol-TMSE, der er analyseret under de samme betingelser.

Figur 1 viser et kromatogram for alkoholfraktionen af en jomfruolie.

5.4.5. Kvantitativ vurdering

5.4.5.1. Toparealerne for 1-eicosanol og de alifatiske alkoholer fra C_{22} til C_{28} beregnes ved hjælp af den integrerende tæller.

5.4.5.2. Koncentrationen af hver enkelt alkohol beregnes i mg/100 g fedtstof som følger:

$$\text{alkohol x} = \frac{A_x \times m_s \times 100}{A_s \times m}$$

hvor:

A_x = toparealet for alkohol x i kvadratmillimeter

A_s = arealet af 1-eicosanoltoppen i kvadratmillimeter

m_s = massen af tilsat 1-eicosanol i milligram

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

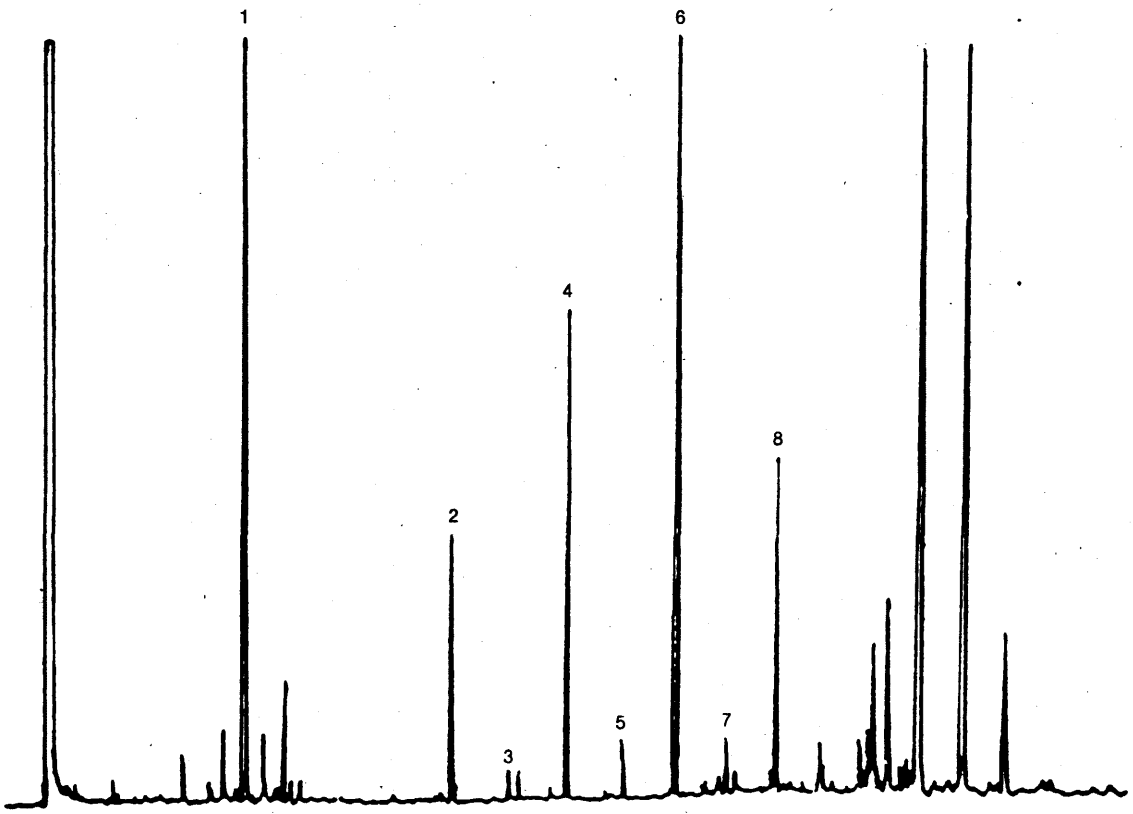
6. RAPPORTERING AF RESULTATERNE

Koncentrationerne af de enkelte alifatiske alkoholer angives som mg/100 g fedtstof og deres sum som »total mængde alifatisk alkohol«.

APPENDIX

Bestemmelse af gassens lineære hastighed

Med gaskromatografen indstillet på normale driftsbetingelser injiceres 1 — 3 µl methan (eller propan), og man måler den tid, det tager for gassen at passere gennem søjlen fra tidspunktet for injektionen til det tidspunkt, hvor toppen fremkommer (t_M). Den lineære hastighed i cm/s er givet ved L/t_M, hvor L er søjlens længde i cm, og t_M er den målte tid i sekunder.



Figur 1 — *Kromatogram af alkoholfraktionen af en jomfruolie*

1 = Eicosanol (I. S.)
2 = Dicosanol
3 = Tricosanol
4 = Tetracosanol
5 = Pentacosanol
6 = Hexacosanol
7 = Heptacosanol
8 = Octacosanol

BILAG V

BESTEMMELSE AF SAMMENSÆTNINGEN OG INDHOLDET AF STEROLER VED GASKROMATOGRAFI PÅ KAPILLARSØJLE

1. OMRÅDE

Metoden beskriver en fremgangsmåde til bestemmelse af indholdet af de enkelte steroler og det samlede sterolindhold i fedtstoffer.

2. METODENS PRINCIP

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

Sterolfraktionen adskilles fra ekstrakten af stoffer, som ikke kan forsæbes, ved kromatografi på en basisk kiselgelplade. De steroler, som genvindes fra kiselgelen, omdannes til trimethylsilylethere og analyseres ved hjælp af gaskromatografi på kapillarsøjle.

3. APPARATUR

3.1. 250 ml kolbe monteret med en refluxsvaler med samlinger med glasslib.

3.2. 500 ml skilletragte.

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 µl og 500 µl mikrosprøjter.

3.7. En cylindrisk filtertragt med et G3 porøst septum (porøsitet 15—40 µm), med en diameter på ca. 2 cm og en dybde på ca. 5 cm, med en befæstelsesdel, der er egnet til filtrering under vakuum, og en samlingsdel med et 12/21 udvendig konisk glasslib.

3.8. En 50 ml konisk vakuumkolbe med et 12/21 indvendig konisk glasslib, som filtertragten (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, forsynet med et spaltningssystem, der består af:

3.10.1. Et termostatkammer til søjler, som kan opretholde den ønskede temperatur med en nøjagtighed på ± 1° C.

3.10.2. En inddampningsenhed med temperaturindstilling, med et fordampningselement af silanglas.

3.10.3. En flammeioniserings-detektor og en omformer-forstærker.

3.10.4. En integrerende skriver, der er egnet til brug med omformer-forstærkeren (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, helt overtrukket med SE-52 eller SE-54 væske eller tilsvarende i en ensartet tykkelse på mellem 0,10 og 0,30 µm.

3.12. En 10 µl gaskromatografi-mikrosprøjte med hærdet kanyle.

4. REAGENSER

4.1. Kaliumhydroxid, ca. 2 N, i ethanolopløsning. 130 g kaliumhydroxid (minimum titer 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, analyseren.

4.3. Vandfrit natriumsulfat, analyserent.

4.4. Glasplader overtrukket med kiselgel, uden fluorescensindikator, tykkelse 0,25 mm (kan fås brugsfærdige i handelen).

4.5. Kaliumhydroxid, 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 (5.2.2).

4.7. Acetone, til kromatografi (5.2.2).

4.8. Hexan, til kromatografi (5.2.2).

4.9. Diethylether, til kromatografi (5.2.2).

4.10. Chloroform, analyseren.

4.11. Referenceopløsning til tyndtlagskromatografi: cholesterol eller phytosteroler, 5 % opløsning i chloroform.

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. Referenceopløsninger af sterol-trimethylsilylethere (TMSE). Friskfremstillet ud fra rene steroler eller blandinger af steroler udvundet af sterolholdige olier.

4.17. α-cholestanol, 0,2 % opløsning (m/v) i chloroform (intern standard).

4.18. Bæregas: Hydrogen eller helium, gaskromatografiren.

4.19. Hjælpegasser:

— Hydrogen, gaskromatografiren

— Luft, gaskromatografiren.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. Forberedelse af de ikke-forsæbelige stoffer

5.1.1. Et rumfang 0,2 % α-cholestanolopløsning i chloroform (4.17), der indeholder en mængde α-cholestanol svarende til ca. 10 % af sterolindholdet i den del af prøven, der er taget ud til bestemmelsen, indføres i 250 ml kolben ved hjælp af 500 µl mikrosprøjten. F.eks. sættes til 5 g af prøven 500 µl 0,2 % α-cholestanolopløsning, hvis undersøgelsen gælder olivenolie, og 1 500 µl, hvis det gælder frøolier eller 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.

Animalske eller vegetabilske olier og fedtstoffer, der indeholder betydelige mængder cholesterol, kan vise en top, der har den samme retentionstid som α-cholestanol. Hvis det forekommer, må sterolfraktionen analyseres to gange med og uden intern standard.

5.1.2. 50 ml 2 N kaliumhydroxid i ethanolopløsning tilsættes, refluxsvaleren påsættes, og væsken opvarmes til svag kogning på vandbad under vedvarende, kraftig omrøring, 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. Kolbens indhold overføres kvantitativt til en 500 ml skilletragt, idet der skylles flere gange med destilleret vand, ialt ca. 50 ml. Ca. 80 ml diethylether tilsættes, tragten rystes kraftigt i ca. 30 sekunder og får lov til at henstå (note 1).

Den nederste, 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: Eventuel emulsion kan ødelægges ved tilsætning af små mængder ethyl- eller methylalkohol ved hjælp af en spray.

5.1.4. Etherekstrakterne samles i en enkelt skilletragt og vaskes med destilleret vand (50 ml ad gangen), indtil vaskevandet giver en neutral reaktion.

Når vaskevandet er fjernet, tørres ekstrakterne med vandfrit natriumsulfat og filtreres på vandfrit natriumsulfat ned i en på forhånd vejet 250 ml kolbe, idet tragt og filter vaskes med små mængder diethylether.

5.1.5. Etheren 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 så efter afkøling i en ekssikkator.

5.2. **Separation af sterolfraktionen**

5.2.1. Forberedelse af de basiske plader. Kiselgelpladerne (4.4) nedsænkes fuldstændig i 0,2 N opløsningen af kaliumhydroxid i ethanol (4.5) i 10 sekunder. Derefter får de lov at tørre i et stinkskab i 2 timer og sættes til sidst i en ovn ved 100° C i 1 time.

Pladerne tages ud af ovnen og opbevares i en calciumchlorid-ekssikkator, 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 sterolfraktionen, er det ikke nødvendigt at behandle de ikke-forsæbelige stoffer med aluminiumoxid. På denne måde holdes alle sure forbindelser (fede syrer og andre) tilbage på basislinien, og sterolbåndet er klar adskilt fra de alifatiske og triterpene alkoholers bånd.

5.2.2. En 95:5 (v/v) benzen/acetoneblanding anbringes i kromatografikammeret til en højde på ca. 1 cm. Som et alternativ kan en 65:35 (v/v) hexan/diethyletherblanding bruges. Kammeret lukkes med det dertil passende dæksel og efterlades således i ca. en halv time, så at der opnås ligevægt mellem væske og damp. Strimler af filtrerpapir, 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 3: Kromatografiblandingen bør udskiftes for hver test for at opnå fuldstændig reproducerbare elueringsbetingelser.

5.2.3. Man tilbereder en ca. 5 % opløsning af de ikke-forsæbelige stoffer (5.1.5) i chloroform. Med 100 µl mikrosprøjten afsætter man på en kromatografiplade (5.2.1) med 0,3 ml, ca. 2 cm fra den ene ende, en streg, som er så tynd og ensartet som muligt. På linie med stregen placeres 2—3 µl af sterol-referenceopløsningen (4.11) i den ene ende af pladen, så sterolbåndet kan identificeres efter eluering.

5.2.4. Pladen anbringes i kromatografikammeret, som er forberedt som angivet i 5.2.2. Den omgivende temperatur bør holdes mellem 15 og 20° C. Kammeret lukkes straks med dækslet, og det får lov til at eluere, indtil opløsningsmidlets forkant når ca. 1 cm fra pladens øverste kant. Derpå fjernes pladen fra kromatografikammeret, og man lader opløsningsmidlet fordampe i en strøm af varm luft eller ved at lade pladen stå en kort tid i et stinkskab.

5.2.5. Pladen sprøjtes let og ensartet med 2,7-dichlorfluorosceinopløsningen. Når pladen observeres under ultraviolet lys, kan sterolbåndet identificeres ved, at det bringes på linie med den plet, der er opnået fra referenceopløsningen. Båndets grænser langs fluoroscenses kanter markeres med en sort blyant.

5.2.6. Med en metalspatel skraber man kiselgelen af i det markerede område. Det fint pulveriserede materiale, der er fjernet, placeres i filtertragten (3.7). 10 ml varm chloroform tilsættes, man blander omhyggeligt med metalspatelen og filtrerer under vakuum; filtratet opsamles i den koniske kolbe (3.8), der er forbundet med filtertragten.

Det tilbageholdte materiale i tragten vaskes tre gange med diethylether (ca. 10 ml hver gang), idet filtratet samles i den samme kolbe, der er forbundet med filtertragten. Filtratet inddampes til et rumfang af 4—5 ml, den tilbageværende opløsning overføres til det på forhånd vejede 10 ml prøverør (3.9), det inddampes til tørhed med let opvarmning i en blød strøm af nitrogen, der fyldes atter op med nogle få dråber acetone, der inddampes igen til tørhed, røret placeres i en ovn ved 105° C i ca. 10 minutter, derefter lader man det svale af i en ekssikkator og vejer det.

Den rest, der findes i prøverøret, består af sterolfraktionen.

5.3. **Forberedelse af trimethylsilyletherne**

5.3.1. Til prøverøret, der indeholder sterolfraktionen, sættes silyleringsreagenset, der består af en 9:3:1 (v/v/v) blanding af pyridin/hexamethyl-disilazan/trimethyl-chlorsilan (note 4), i forholdet 50 µl for hvert milligram sterol, idet enhver optagelse af fugt undgås (note 5).

Note 4: Brugsfærdige opløsninger kan fås i handelen. Man kan også få andre silyleringsreagenser som f.eks. bis-trimethylsilyltrifluor-acetamid + 1 % trimethyl-chlorsilan, som skal fortyndes med et lige så stort rumfang vandfrit pyridin.

5.3.2. Prøverøret tilproppes, rystes omhyggeligt (uden at vende bunden i vejret på det), indtil sterolerne er fuldstændig opløst. Man lader det stå i mindst 15 minutter ved stuetemperatur og centrifugerer det så i nogle få minutter. Den klare opløsning er parat til gaskromatografisk analyse.

Note 5: Den lette opalisering, som kan fremkomme, er normal og giver ikke anledning til interferens. Hvis der dannes hvide fnug eller fremkommer en lyserød farve, er det et tegn på tilstedeværelsen af fugt eller svækkelse af reagensen. Hvis det forekommer, må prøven gentages.

5.4. **Gaskromatografisk analyse**

5.4.1. Forberedende operationer, pakning af søjlen

5.4.1.1. Søjlen monteres i gaskromatografen, idet indløbsenden forbindes med fordamperen, der står i forbindelse med spaltningssystemet, og udløbsenden forbindes med detektoren.

Man foretager en generel kontrol af gaskromatografen (lækager fra gaskredsløbene, detektorens effektivitet, spaltningssystemets og registreringssystemets 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 6). Denne temperatur opretholdes i mindst 2 timer, derefter sættes hele enheden i driftstilstand (justering af gasstrømme og spaltning, antændelse af flammen, forbindelse til den elektroniske skriver, justering af søjlekammeret, detektorens og injektorens temperatur osv.), og derefter optegens signalet med en følsomhed, der er mindst to gange større end den, man agter at anvende til analysen. Basisliniens forløb skal være lige, uden toppe af nogen art, og den må ikke glide.

Negativ glidning af en lige linie tyder på lækage fra søjlens forbindelser, positiv glidning tyder på utilstrækkelig konditionering af søjlen.

Note 6: 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. De anbefalede driftsbetingelser er som følger:

— søjletemperatur: 260° C ± 5° C

— fordampertemperatur: 280° C

— detektortemperatur: 290° C

— bæregassens lineære hastighed: helium 20—35 cm/s, hydrogen 30—50 cm/s

— spaltningsforhold: fra 1:50 til 1:100

— instrumentets følsomhed: fra 4 til 16 gange den minimale dæmpning

— registreringsfølsomhed: 1—2 mV fuld skala

— papirhastighed: 30—60 cm/time

— mængde stof injiceret: 0,5—1 µl TMSE-opløsning.

Disse betingelser kan varieres i lyset af søjlens og gaskromatografens egenskaber, så man opnår kromatogrammer, der opfylder følgende krav:

— retentionstiden for β-sitosterol bør være 20 ± 5 minutter

— campesteroltoppen bør være: for olivenolie (gennemsnitsindhold 3 %) 15 ± 5 % af hel skala; for soyaolie (gennemsnitsindhold 20 %) 80 ± 10 % af hel skala

— alle tilstedeværende steroler skal adskilles. Desuden skal toppene også være fuldstændig opløst, dvs. hver tops spor skal gå tilbage til basislinien, før sporet går op til den næste top. Ufuldstændig opløsning kan dog tolereres, såfremt toppen ved TRR (relativ retentionstid) 1,02 kan bestemmes kvantitativt ved brug af den vinkelrette linie.

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—1 µl af prøveopløsningen op. Stemplet trækkes højere op, så kanylen tømmes. Kanylen trykkes gennem injektionsenhedens membran, og efter 1—2 sekunder injiceres hurtigt, derefter fjernes kanylen langsomt efter ca. 5 sekunder.

5.4.3.2. Optegnelsen fortsættes, indtil de tilstedeværende sterolers TMSE er fuldstændig elueret.

Basislinien skal til stadighed opfylde kravene (5.4.1.2).

5.4.4. Identifikation af toppene

De enkelte toppe identificeres på basis af retentionstiderne og ved sammenligning med blandinger af sterol-TMSE, der er analyseret under de samme betingelser.

Sterolerne elueres i følgende rækkefølge: cholesterol, brassicasterol, 24-methylencholesterol, campesterol, campestanol, stigmasterol, Δ-7-campesterol, Δ-5,23-stigmastadienol, clerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ-5-avenasterol, Δ-5,24-stigmastadienol, Δ-7-stigmastenol, Δ-7-avenasterol.

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

Figur 1 og 2 illustrerer typiske kromatogrammer for nogle olier.

5.4.5. Kvantitativ vurdering

5.4.5.1. Arealerne for α-cholestanol- og steroltoppene beregnes ved hjælp af den integrerende tæller. Der ses bort fra toppene for eventuelle forbindelser, der ikke er blandt dem, der er opregnet i tabel 1.

5.4.5.2. Koncentrationen af hver enkelt sterol beregnes i mg/100 g fedtstof som følger:

$$\text{sterol x} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m}$$

hvor:

A_x = toparealet for sterol x i kvadratmillimeter

A_s = arealet af α-cholestanoltoppen i kvadratmillimeter

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/100 g fedtstof og deres sum som »total sterolmængde«.

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

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

hvor:

A_x = arealet af top x

ΣA = summen af arealerne af alle toppe.

APPENDIX

Bestemmelse af gassens lineære hastighed

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

Den lineære hastighed i cm/s er givet ved L/t_M, hvor L er søjlens længde i cm, og t_M er den målte tid i sekunder.

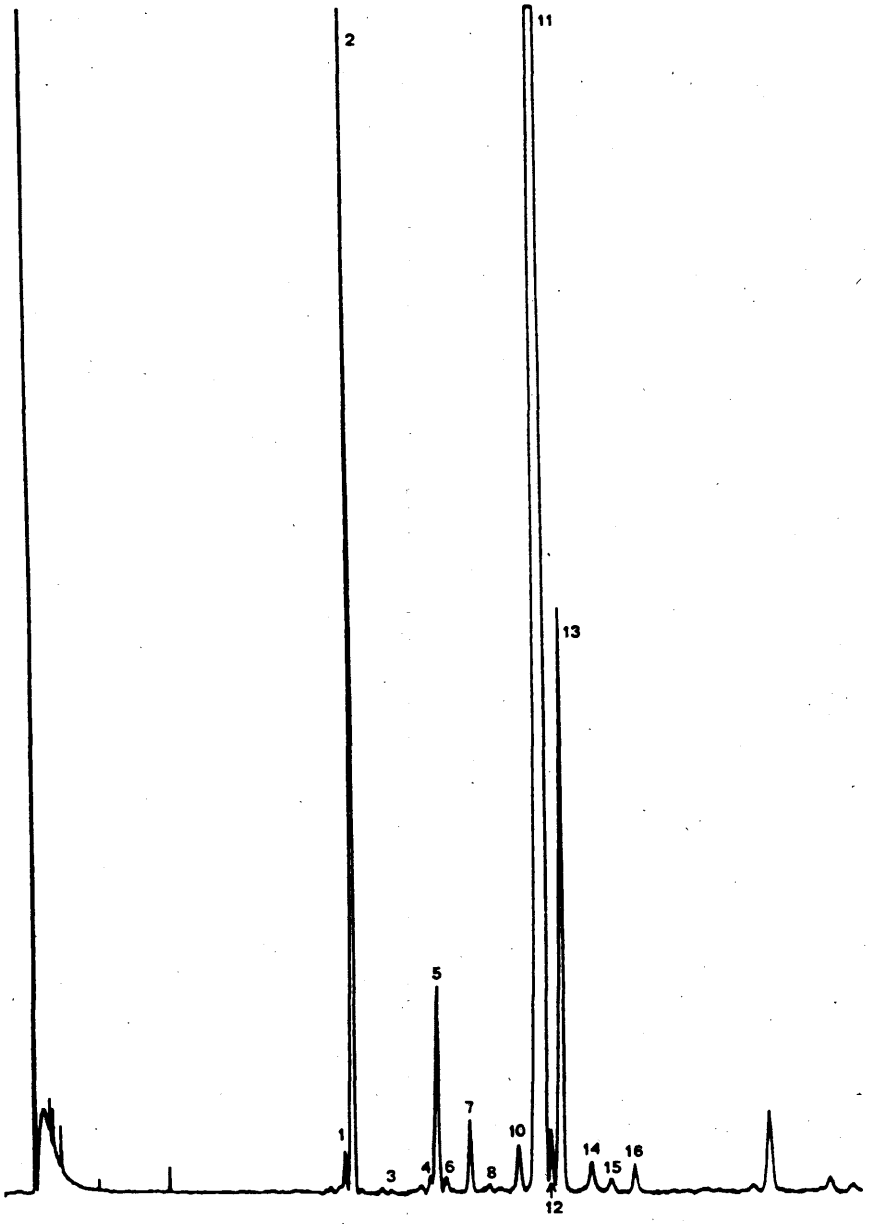
Tabel 1

Relative retentionstider for steroler

Top	Identifikation		Relativ retentionstid	
			SE 54 søjle	SE 52 søjle
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
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	chlerosterol	[24S]-24-ethyl-Δ-5,25-cholastadien-3-β-ol	0,96	0,96
11	β-sitosterol	[24R]-24-ethyl-Δ-5-cholestan-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-5-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-7,24-cholestadien-3-β-ol	1,12	1,12
16	Δ-7-avenasterol	[24Z]-24-ethyliden-Δ-7-cholesten-3-β-ol	1,16	1,16

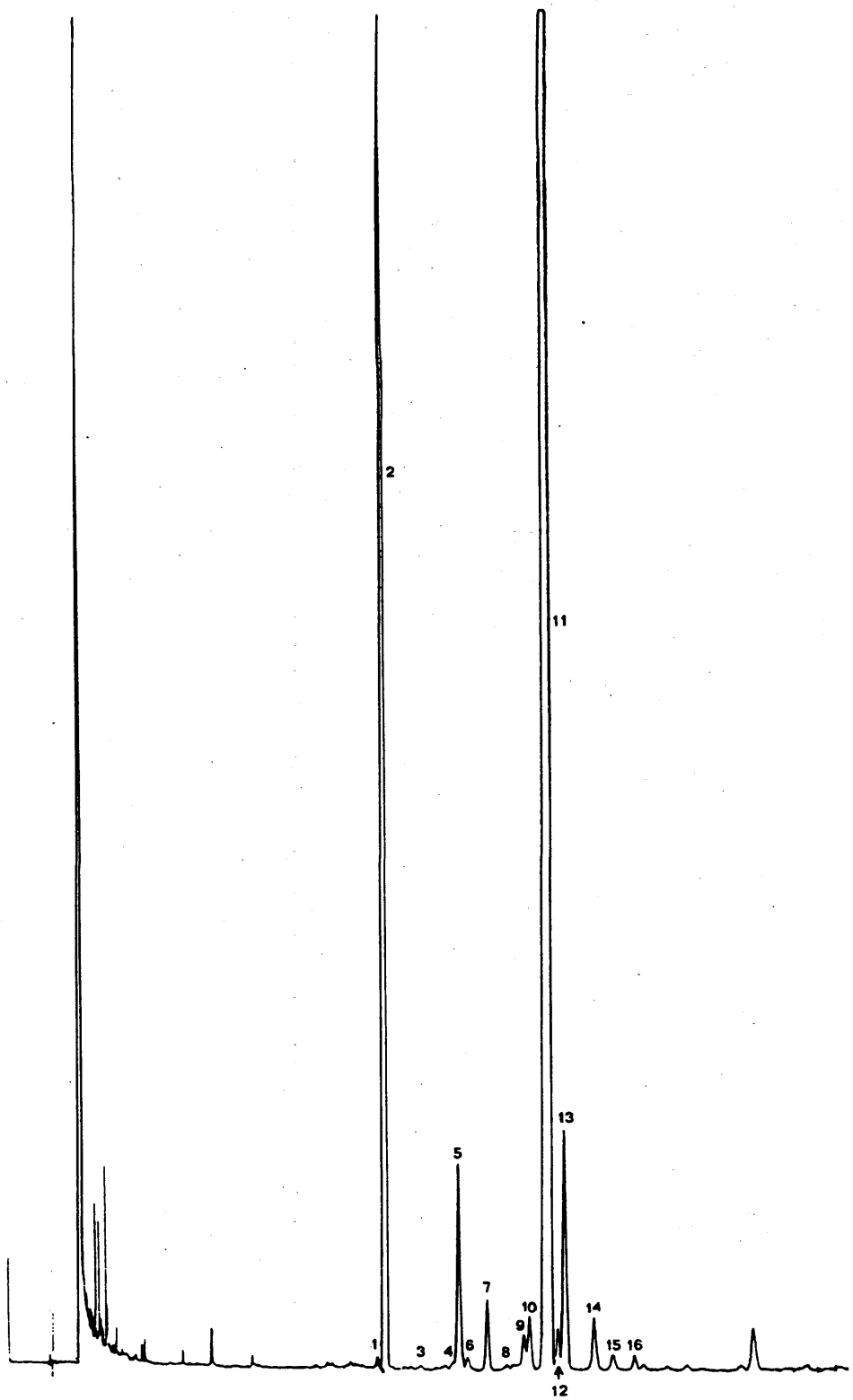
Figur 1

Gaskromatogram af sterolfraktionen af en uraffineret olivenolie



Figur 2

Gaskromatogram af sterolfraktionen af en raffineret olivenolie



BILAG VI

BESTEMMELSE AF ERYTHRODIOL OG UVAOL

INDLEDNING

Erythrodiol (almindeligvis forstået som totalindholdet af diolerne erythrodiol og uvaol) er en uforsæbelig bestanddel, som er karakteristisk for visse arter af fedtstoffer. Den findes i betydeligt højere koncentration i ekstraheret olivenolie end i de andre olier, som den findes i (presset olivenolie, vindruekerneolie), hvorfor bestemmelsen heraf kan anvendes til at konstatere tilstedeværelsen af ekstraheret olivenolie.

1. FORMÅL

At beskrive fremgangsmåden til bestemmelse af erythrodiol i fedtstoffer.

2. PRINCIP

Fedtstoffer forsæbes med kaliumhydroxid i ethanolopløsning, og de uforsæbelige bestanddele ekstraheres derefter med diethylether og renses på en kolonne af aluminiumoxid.

De uforsæbelige bestanddele fraktioneres ved tyndtlagskromatografi på kiselgel, hvorved båndet med sterolfraktionen adskilles fra båndet med erythrodiolfraktionen.

Sterolfraktionen og erythrodiolfraktionen fra pladen omdannes til trimethylsilylethere, hvorefter blandingen analyseres ved gaskromatografi.

Resultatet angives i procent erythrodiol i forhold til det samlede indhold af erythrodiol plus steroler.

3. APPARATUR

3.1. Det apparatur, som er foreskrevet i bilag V (bestemmelse af sterolindholdet).

4. REAGENSER

4.1. De reagenser, som er foreskrevet i bilag V (bestemmelse af sterolindholdet).

4.2. Referenceopløsning af erythrodiol, 0,5 % opløsning i chloroform.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. **Femstilling af de uforsæbelige stoffer**

Der gås frem som beskrevet i afsnit 5.1.2 i bilag V.

5.2. **Separation af erythrodiol og steroler**

5.2.1. Se afsnit 5.2.1 i bilag V.

5.2.2. Se afsnit 5.2.2 i bilag V.

5.2.3. Der fremstilles en 5 % opløsning i chloroform af de uforsæbelige stoffer.

Med en mikrosprøjte på 100 µl anbringes på en kromatografiplade ca. 1,5 cm fra den nederste kant 0,3 ml af denne opløsning i en streg, der er så tynd og ensartet som muligt. På den ene ende af pladen anbringes som reference nogle mikroliter af opløsningen af cholesterol og erythrodiol.

5.2.4. Pladen anbringes i kromatografikarret, der er klargjort som angivet i 5.2.2 i bilag V. Den omgivende temperatur holdes på ca. 20° C. Karret lukkes straks, og der elueres, indtil opløsningsmiddelfronten er ca. 1 cm fra pladens øverste kant. Derpå fjernes pladen fra kromatografikarret, og man lader opløsningsmidlet fordampe i en strøm af varm luft.

5.2.5. Pladen sprøjtes ensartet med en alkoholopløsning af 2,7-dichlorfluorescein. Når pladen observeres under ultraviolet lys, fremstår sterol- og erythrodiolbåndene ud for pletterne fra referenceopløsningen, og de afmærkes med et punkt lidt uden for det fluorescerende bånds kanter.

5.2.6. Med en metalspatel skrabes kiselgelen i det markerede område af. Det afskrabede materiale fra pladen overføres til en kolbe på 50 ml. Der tilsættes 15 ml varm chloroform, omrystes omhyggeligt og filtreres på glasfilter, idet siliagelen overføres til selve filteret. Der vaskes tre gange med 10 ml portioner varm chloroform, idet filtratet opsamles i en rundbundet kolbe på 100 ml. Filtratet inddampes til et rumfang på 4—5 ml og overføres til et tareret spidsbundet centrifugeglas på 10 ml, og der inddampes til tørhed under let opvarmning i en svag strøm af nitrogen, hvorefter der vejes.

5.3. Forberedelse af trimethylsilyletherne (TMSE)

Der gås frem som beskrevet i afsnit 5.3 i bilag V.

5.4. Gaskromatografi

Der gås frem som beskrevet i afsnit 5.4 i bilag V.

Arbejdsbetingelserne for gaskromatograferingen skal vælges således, at de udover at opfylde kravene for analyse af sterolerne også fører til separation af TMSE af erythrodiol og uvaol.

Efter injektion af prøven lader man skriveren køre indtil alle tilstedeværende steroler, erythrodiol og uvaol er elueret. Derefter identificeres toppene (erythrodiol og uvaol har i forhold til β-sitosterol en relativ retentionstid på henholdsvis ca. 1,45 og 1,55), og arealerne beregnes som angivet for sterolerne.

6. ANGIVELSE AF RESULTATERNE

$$\text{Erythrodiol \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \Sigma A_{\text{steroler}}} \times 100$$

hvor:

A_1 = toparealet for erythrodiol i mm²

A_2 = toparealet for uvaol i mm²

$\Sigma A_{\text{steroler}}$ = summen af arealerne for de tilstedeværende steroler i mm²

Resultatet angives med én decimal.

BILAG VII

BESTEMMELSE AF FEDTSYRER I 2-POSITIONEN I TRIGLYCERIDER FRA OLIER OG FEDTSTOFFER

1. OMFANG

I denne standard beskrives en metode til bestemmelse af sammensætningen af den del af fedtsyrerne i en olie eller et fedtstof, som er forestret til glycerolens 2-position.

2. ANVENDELSESOMRÅDE

Denne standard finder som følge af pankreas-lipases særlige virkning anvendelse på olie og fedtstoffer med et smeltepunkt på under 45° C. Den kan ikke uden videre anvendes på olier og fedtstoffer, der indeholder betydelige mængder fedtsyrer med 12 eller færre kulstofatomer (kokos- og palmekerneolie, smørfedt), stærkt umættede fedtsyrer (med mere end fire dobbeltbindinger), med 20 eller flere kulstofatomer (fiskeolie og marine olier) eller fedtsyrer indeholdende andre oxygenerede grupper end syregruppen.

3. PRINCIP

Eventuel neutralisering af sure olier og fedtstoffer i opløsning. Rensning på kolonne af aluminiumoxid. Delvis hydrolyse af triglycerider ved hjælp af pankreas-lipase inden for et bestemt tidsrum. Separation af de dannede monoglycerider ved tyndtlagskromatografi og methanolyse af disse monoglycerider. Analyse af methylesterne ved gas/væskekromatografi.

4. APPARATUR

4.1. 100 ml rundbundet kolbe.

4.2. 25 ml rundbundet kolbe med slib.

4.3. 1 m lang svaler, som passer til kolben 4.2.

4.4. 250 ml Erlenmeyer-kolbe.

4.5. 50 ml bægerglas.

4.6. 500 ml skilletragt.

4.7. Kromatografisøjle af glas, 13 mm indvendig diameter og 400 mm lang, forsynet med glasfilter og hane.

4.8. 10 ml centrifugeglas med slibprop.

4.9. 5 ml burette med 0,05 ml inddelinger.

4.10. 1 ml injektionssprøjte med tynd kanyle.

4.11. Mikrosprøjte, som kan levere dråber på 3—4 µl.

4.12. Udstrygningsapparat til tyndtlagskromatografi.

4.13. Glasplader til tyndtlagskromatografi, 20 × 20 cm.

4.14. Elueringskar til tyndtlagskromatografi med slebet glaslåg egnet til 20 × 20 cm plader.

4.15. Spray til tyndtlagskromatografi.

4.16. Ovn indstillet til 103 ± 2° C.

4.17. Termostat, som mellem 30 og 45° C kan reguleres med en nøjagtighed på 0,5° C.

4.18. Rotationsfordamper.

4.19. Elektrisk rysteapparat, som muliggør en kraftig omrystning af centrifugeglasset.

4.20. UV-lampe til undersøgelse af tyndtlagsplader.

Til kontrol af lipaseaktiviteten:

4.21. pH-meter.

4.22. Spiralomrører.

4.23. 5 ml burette.

4.24. Stopur.

For eventuel fremstilling af lipase:

4.25. Laboratorieomrører, egnet til dispergering og blanding af heterogene materialer.

5. REAGENSER

5.1. n-hexan, eller i mangel heraf petroleumsether (kogepunkt 30—50° C), kromatografikvalitet.

5.2. 2-propanol eller ethanol 95 % (v/v), analyseren kvalitet.

5.3. 2-propanol eller ethanol, 1:1 vandig opløsning.

5.4. Diethylether, peroxidfri.

5.5. Acetone.

5.6. Myresyre, mindst 98 % (m/m).

5.7. Elueringsopløsning: blanding af n-hexan (5.1), diethylether (5.4) og myresyre (5.6) i forholdet 70/30/1 (v/v/v).

5.8. Aktiveret aluminiumoxid til kromatografi, neutral, Brockmann I.

5.9. Silicapulver med bindemiddel, af egnet kvalitet til tyndtlagskromatografi.

5.10. Pankreas-lipase af egnet kvalitet (note 1, note 2).

5.11. Natriumhydroxid, vandig opløsning med 120 g/l.

5.12. Saltsyre, 6 N vandig opløsning.

5.13. Calciumchlorid ($CaCl_2$), vandig opløsning med 220 g/l.

5.14. Natriumcholat (enzymkvalitet), vandig opløsning med 1 g/l.

5.15. Bufferopløsning: pH af en 1 M vandig opløsning af trishydroxymethylaminomethan bringes op på 8 ved tilsætning af saltsyre (5.12) (kontrolleres med potentiometer).

5.16. Phenolphthalein, opløsning med 10 g/l i 95 % (v/v) ethanol.

5.17. 2,7-dichlorfluorescein, opløsning med 2 g/l i 95 % (v/v) ethanol, gjort svagt alkalisk ved tilsætning af 1 dråbe 1 N natriumhydroxidopløsning pr. 100 ml.

Til kontrol af lipase-aktiviteten:

5.18. Neutraliseret olie.

5.19. Natriumhydroxid, 0,1 N vandig opløsning.

5.20. Natriumcholat (enzymkvalitet), vandig opløsning med 200 g/l.

5.21. Gummi arabicum, vandig opløsning med 100 g/l.

6. PRØVEFORBEREDELSE

Hvis prøvens syreindhold er under 3 %, bestemt efter bilag II, renses den direkte på aluminiumoxid som beskrevet under 6.2.

Er syreindholdet i prøven over 3 %, bestemt efter bilag II, neutraliseres der med alkali ved tilstedeværelse af et opløsningsmiddel som beskrevet under 6.1, efterfulgt af passage over aluminiumoxid som beskrevet under 6.2.

6.1. **Neutralisering med alkali ved tilstedeværelse af opløsningsmiddel.**

Der anbringes ca. 10 g af den rå olie i en skilletragt (4.6), hvorefter der tilsættes 100 ml hexan (5.1), 50 ml 2-propanol (5.2), nogle få dråber phenolphthaleinopløsning (5.16) og en mængde natriumhydroxidopløsning (5.11) svarende til den frie syremængde i olien, plus 0,3 % i overskud. Der omrystes kraftigt i 1 min., tilsættes 50 ml destilleret vand og omrystes igen, hvorefter man lader opløsningen stå og bundfælde.

Efter separation fjernes sæbelaget på bunden, ligesom eventuelle mellemlag (slim, uopløseligt stof) fjernes. Hexanopløsningen af den neutraliserede olie vaskes i flere omgange med 2-propanolopløsning (5.3) i portioner på 25—30 ml, indtil phenolphthaleinets lyserøde farve forsvinder.

Det meste af hexanen fjernes ved destillation under vakuum i rotationsfordamperen (4.18), hvorefter olien tørres ved 30—40° C under vakuum ved hjælp af en strøm af ren nitrogen, indtil hexanen er fjernet fuldstændigt.

6.2. **Rensning på aluminiumoxid**

15 g aktiveret aluminiumoxid (5.8) opslæmmes i 50 ml hexan (5.1), og suspensionen hældes i kromatografisøjlen (4.7) under omrøring. Man lader aluminumoxidet bundfælde sig og lader opløsningsmidlets niveau falde til 1—2 mm over adsorbenten. Derefter hældes forsigt en opløsning af 5 g olie i 25 ml hexan (5.1) på søjlen, og hele eluatet opsamles i en rundbundet kolbe (4.1).

7. FREMSTILLING AF KROMATOGRAFIPLADER

Glaspladerne (4.13) renses grundigt med ethanol, petroleumsether og acetone, så alle spor af fedtstof fjernes.

I en Erlenmeyer-kolbe (4.4) anbringes 30 g silicapulver (5.9), og der tilsættes 60 ml destilleret vand. Derefter tilproppes kolben og rystes kraftigt i 1 min., hvorefter opslæmningen omgående overføres til udstrygningsapparatet (4.12), og de rene plader belægges med et 0,25 mm tykt lag.

Pladerne lufttørres i 15 min. og derefter i 1 time i ovnen (4.16) ved 103 ± 2° C. Pladerne afkøles til stuetemperatur i ekssikkator før brug. Færdigfremstillede plader fås i handelen.

8. FREMGANGSMÅDE

8.1. **Hydrolyse med pankreas-lipase**

I centrifugeglasset (4.8) afvejes ca. 0,1 g af den forberedte prøve. Hvis prøven består af flydende olie, gås direkte frem som beskrevet nedenfor. Består den af fast fedt, opløses den i 0,2 ml hexan, om nødvendigt under forsigtig opvarmning.

Der tilsættes 20 mg lipase (5.10) og 2 ml bufferopløsning (5.15). Der omrystes forsigtigt men omhyggeligt og tilsættes 0,5 ml natriumcholatopløsning (5.14) og 0,2 ml calciumchloridopløsning (5.13). Glasset lukkes med slibprop, rystes forsigtigt (undgå at fugte proppen) og anbringes derefter omgående i termostaten (4.17), som holdes på en temperatur på 40 ± 0,5° C, og rystes i hånden i nøjagtigt 1 min.

Glasset fjernes fra termostaten og omrystes kraftigt ved hjælp af rysteapparatet (4.19) i nøjagtigt 2 min.

Derefter køles omgående i rindende vand. Så tilsættes 1 ml saltsyre (5.12) og 1 ml diethylether (5.4). Glasset tilproppes, og der blandes grundigt ved hjælp af det elektriske rysteapparat. Derefter lader man glasset henstå og fjerner det organiske lag ved hjælp af sprøjten (4.10), om nødvendigt efter centrifugering.

8.2. **Separation af monoglyceriderne ved tyndtlagskromatografi**

Ekstraktet anbringes på kromotografipladen med mikrosprøjten (4.11) ca. 1,5 cm fra den nederste kant i en tynd ensartet linje så smal som mulig. Pladen anbringes i det godt mættede elueringskar (4.14), og der elueres med elueringsvæsken (5.7) ved ca. 20° C op til ca. 1 cm fra pladens øverste kant.

Pladen lufttørres ved karrets temperatur og sprøjtes med 2,7-dichlorfluoresceinopløsning (5.17). Monoglyceridbåndet identificeres (Rf ca. 0,035) under ultraviolet lys (4.20).

8.3. **Analyse af monoglyceriderne ved gas/væskekromatografi**

Det under 8.2 fremkomne bånd fjernes ved hjælp af en spatel (undgå at fjerne restbestanddele på basislinjen) og overføres til methyleringskolben (4.2).

Det afskrabede silica behandles nøjagtigt som beskrevet i bilag X B, så monoglyceriderne omdannes til methylestere, hvorefter esterne undersøges ved gaskromatografi som beskrevet i bilag X A.

9. ANGIVELSE AF RESULTATERNE

Sammensætningen af fedtsyrer i 2-positionen beregnes med én decimals nøjagtighed (note 3).

10. NOTER

Note 1: Test for lipaseaktivitet

I en passende mixer tilberedes en olieemulsion ved omrøring af en blanding af 165 ml gummi arabicum-opløsning (5.21), 15 g knust is og 20 ml neutraliseret olie (5.18).

10 ml af denne emulsion hældes i et bægerglas (4.5), efterfulgt af 0,3 ml natriumcholatopløsning (5.20) og 20 ml destilleret vand.

Bægerglasset sættes i en termostat, der er indstillet til 37 ± 0,5° C (note 4), og elektroderne til et pH-meter (4.21) og en omrører (4.22) nedsænkes i bægerglasset.

Med en burette (4.23) tilsættes dråbevis natriumhydroxidopløsning (5.19), indtil der er opnået et pH på 8,5.

Der tilsættes en tilstrækkelig mængde vandig suspension af lipase (se nedenfor). Så snart pH-meteret viser en pH-værdi på 8,3, startes stopuret (4.24), og der tilsættes dråbevis natriumhydroxidopløsning (5.19) med en sådan hastighed, at pH holdes fast på 8,3. Den forbrugte mængde natriumhydroxidopløsning aflæses hvert minut.

De aflæste værdier afsættes i et diagram med tiden som abscisse og den mængde alkaliopløsning, der kræves til fastholdelse af en konstant pH-værdi, som ordinat. Der skal fremkomme en ret linje.

Den ovenfor omtalte lipasesuspension er en 1‰ (m/m) suspension i vand. Til hver test bør der anvendes tilstrækkeligt af denne suspension til, at der forbruges ca. 1 ml natriumhydroxidopløsning på 4 — 5 min. Almindeligvis er der brug for 1 — 5 mg pulver.

Lipaseenheden er defineret som den mængde enzym, der frigør 10 µ-ækvivalenter syre pr. minut. Aktiviteten A af det anvendte pulver, målt i lipaseenheder pr. mg, beregnes efter formlen:

$$A = \frac{V \times 10}{m}$$

hvor:

V = antal ml natriumhydroxidopløsning (5.19) forbrugt pr. minut, beregnet ud fra diagrammet

m = lipasetestportionens masse i mg.

Note 2: Fremstilling af lipase

Lipaser med tilfredstillende lipaseaktivitet kan fås i handelen, men de kan også fremstilles i laboratoriet på følgende måde: 5 kg frisk svinepankreas afkøles til 0° C. Alt omgivende fedt og bindevæv fjernes, og pankreasvævet finddeles i en blender, indtil der opnås en flydende pasta. Denne omrøres med omrøreren (4.25) i 4 — 6 timer med 2,5 l vandfri acetone og centrifugeres derefter. Bundfaldet ekstraheres yderligere tre gange med den samme mængde acetone, derefter to gange med en blanding af lige dele acetone og diethylether (v/v) og til sidst to gange med diethylether.

Efter tørring af bundfaldet i vakuum i 48 timer opnås et stabilt pulver, som bør opbevares i køleskab.

Note 3: I alle tilfælde tilrådes det at bestemme sammensætningen af prøvens samlede indhold af fedtsyrer, eftersom sammenligningen med sammensætningen af syrer i 2-positionen vil hjælpe med ved fortolkningen af de fundne data.

Note 4: Hydrolysetemperaturen er fastsat til 37° C, eftersom der anvendes en flydende olie. Den er dog fastsat til 40° C for analyseprøven, så der bliver mulighed for at undersøge fedtstoffer med smeltepunkter på op til 45° C.

BILAG VIII

BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF TRILINOLEIN

1. OMFANG

Bestemmelse af sammensætningen af triglycerider i flydende vegetabilske olier, udtrykt ved deres ævivalente kulstoftal, ved højtryks væskekromatografi.

I denne standard beskrives en metode til separation og kvantitativ bestemmelse af triglyceridsammensætningen af vegetabilske olier, udtrykt ved deres molekylvægt og grad af umættethed som funktion af deres ækvivalente kulstoftal (note 1).

2. ANVENDELSESOMRÅDE

Denne standard finder anvendelse på alle vegetabilske olier indeholdende triglycerider af langkædede fedtsyrer. Metoden er specielt anvendelig til påvisning af små mængder ikke-tørrende (linolsyreholdige) olier i de vegetabilske olier, hvor oliesyre er den fremherskende umættede festsyrer, såsom olivenolie.

3. PRINCIP

Separation af triglycerider efter deres ækvivalente kulstoftal ved højt ydende væskekromatografi (med omvendt fase) og tolkning af kromatogrammerne.

4. APPARATUR

4.1. Højtydende væskekromatograf med mulighed for termostatisk kontrol af kolonnetemperaturen.

4.2. Injektionsenhed for portioner på 10 µl.

4.3. Detektor: differentialrefraktometer. Følsomheden bør være mindst 10^{-4} af fuldt udslag.

4.4. Kolonne: rør af rustfrit stål, længde 250 mm og indvendig diameter 4,5 mm, fyldt med silicapartikler med en diameter på 5 µm og med 22—23 % kulstof i form af octadecylsilan (note 2).

4.5. Skriver og/eller integrator.

5. REAGENSER

Reagenserne skal være af analysekvalitet. Elueringsvæskerne skal være afluftede og kan recirkuleres adskillige gange uden indflydelse på separationerne.

5.1. Chloroform.

5.2. Acetone.

5.3. Acetonitril.

5.4. Elueringsvæske: acetonitril + acetone (i et indbyrdes forhold, som fører til den ønskede separation; der begyndes med en blanding i forholdet 50:50).

5.5. Opløsningsmiddel for analyseprøven: acetone eller en blanding af acetone/chloroform i forholdet 1:1.

5.6. Referencetriglycerider: enten anvendes glycerider, som fås i handelen (tripalmitin, triolein osv.), hvis retentionstider afsættes mod det ækvivalente kulstoftal, eller der anvendes et referencekromatogram af soyaolie (se note 3 og 4 og figur 1 og 2).

6. PRØVEFORBEREDELSE

Der fremstilles en 5 % opløsning af de prøver, 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 for analyseprøven (5.5).

7. FREMGANGSMÅDE

7.1. Kromatografisystemet gøres klar, og der pumpes elueringsvæske (5.4) 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 forberedt som under (6).

8. BEREGNING OG ANGIVELSE AF RESULTATERNE

Der anvendes intern standard, dvs. at summen af toparealerne svarende til de forskellige triglycerider sættes lig med 100 %. Den procentvise andel af hvert triglycerid beregnes efter formlen:

$$\% \text{ triglycerid} = \frac{\text{topareal}}{\text{summen af alle toparealer}} \times 100$$

idet resultatet angives med én decimal.

Note 1: Elueringsrækkefølgen kan bestemmes ved beregning af de ækvivalente kulstoftal, ofte defineret ved udtrykket ECN = CN – 2n, hvor CN er kulstoftallet, og n er antallet af dobbeltbindinger. Det kan beregnes mere nøjagtigt, hvis der tages hensyn til dobbelbindingens oprindelse. Hvis n_o, n_l og n_{ln} er antallet af dobbeltbindinger i henholdsvis olie-, linol- og linolensyre, kan det ækvivalente kulstoftal beregnes efter formlen:

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

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

$$ECN = CN - [2{,}60\ n_o] - [2{,}35\ n_l] - [2{,}17\ n_{ln}]$$

Note 2: Eksempler: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333
Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art 50377 eller lignende.

Note 3: Med adskillige referencetriglycerider er det også muligt at beregne opløsningsevnen med hensyn til triolein,

$$\alpha = \frac{RT'}{RT'_{olein}}$$

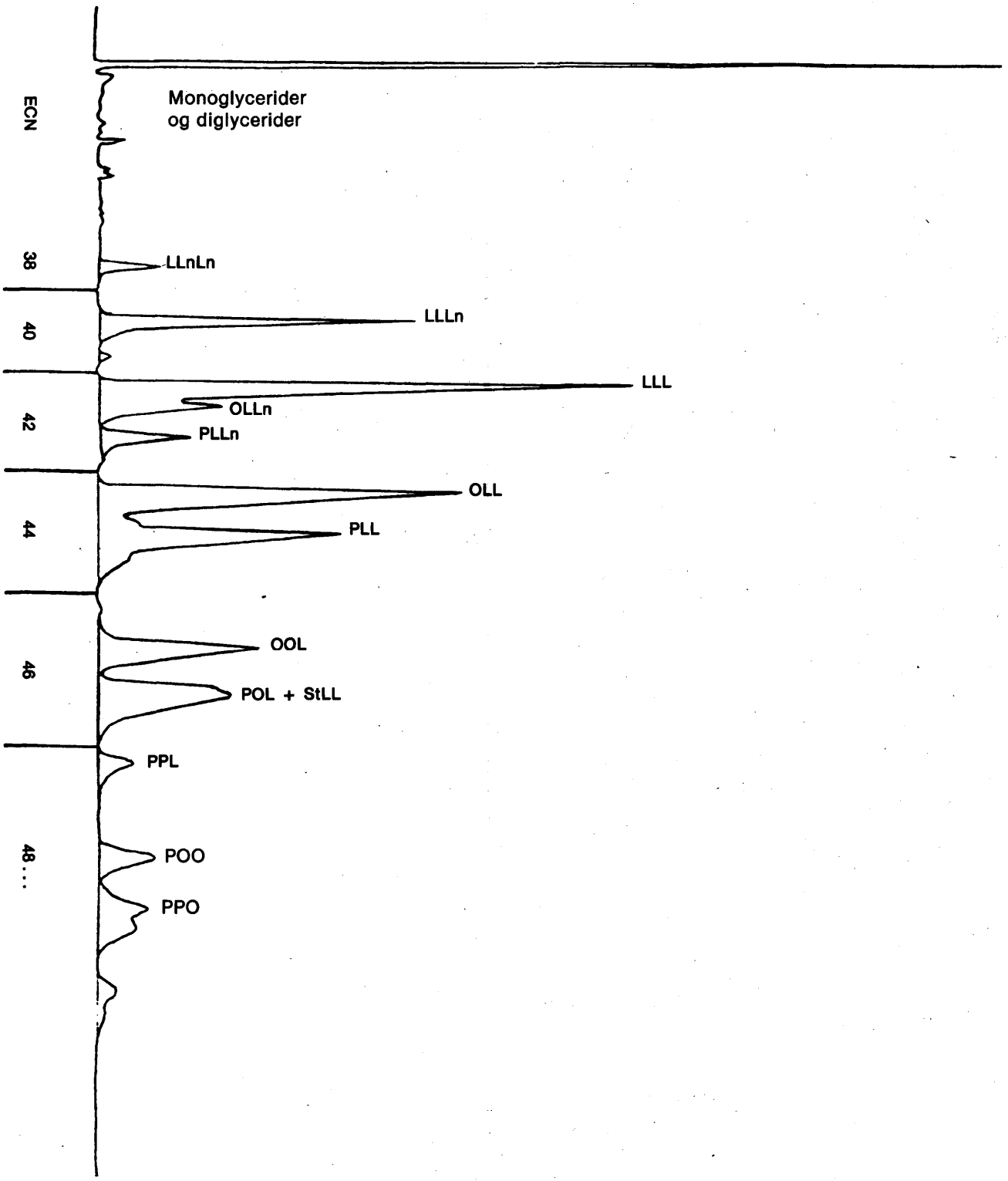
ved hjælp af den reducerede retentionstid $RT' = RT - RT_{opløsningsmiddel}$

Ud fra en afbildning af log α mod f (antal dobbeltbindinger) kan retentionsværdierne for alle de triglycerider af fedtsyrer, som findes i referenctriglyceriderne, bestemmes — se figur 2.

Note 4: Kolonnen skal være så effektiv, at toppene af LLL (trilinolein) adskilles helt fra toppene af triglyceriderne med næsten samme retentionstid.

Figur 1

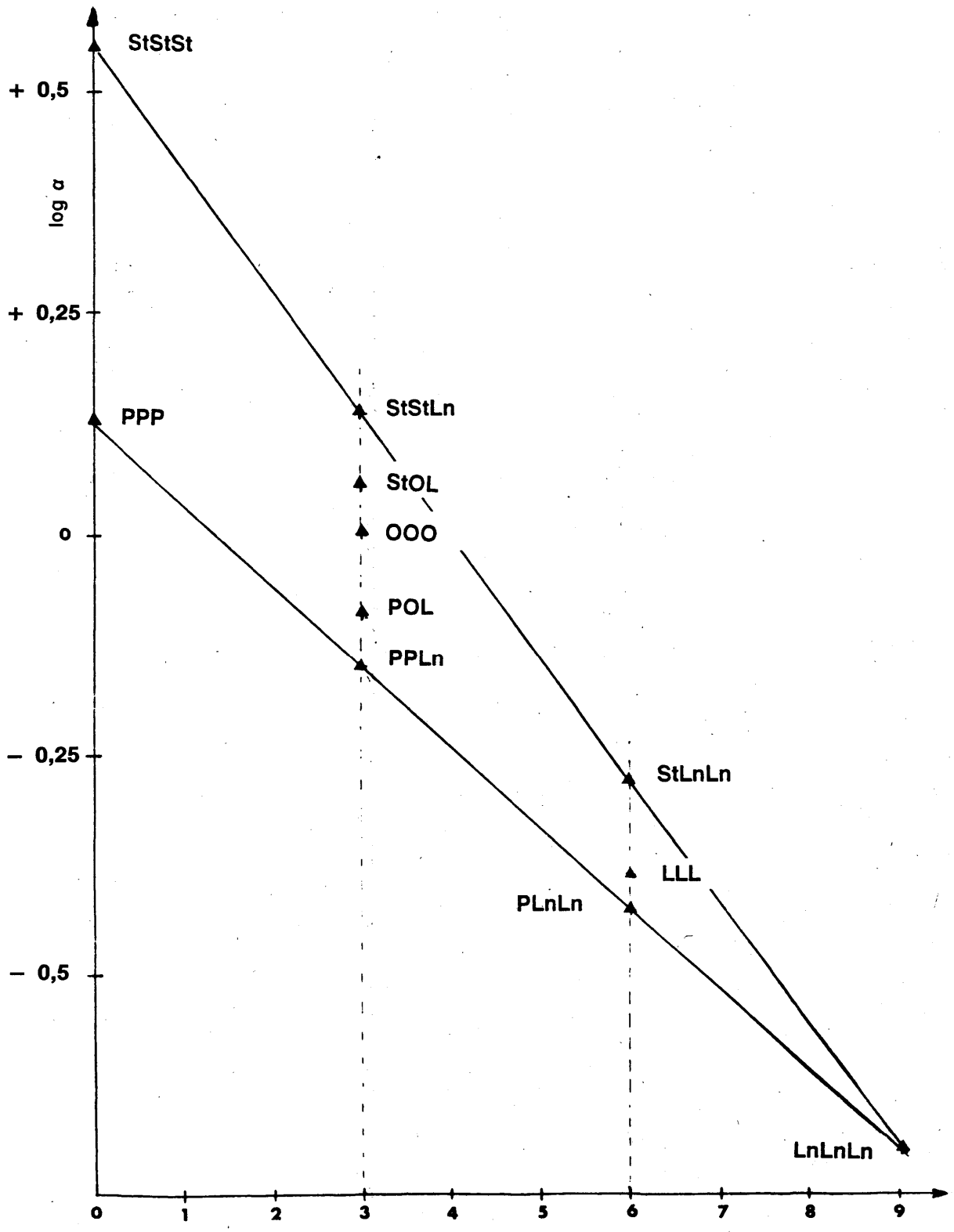
Kromatogram af en prøve af soyaolie



P: palmitinsyre; St: stearinsyre; O: oliesyre; L: linolsyre; Ln: linolensyre.

Figur 2

Afbildning af log α mod f (antal dobbeltbindinger)



La: laurinsyre; My: myristinsyre; P: palmitinsyre; St: stearinsyre; O: oliesyre; L: linolsyre; Ln: linolensyre.

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 i det, frembragt ved teknologiske processer.

Absorptionen ved de bølgelængder, der er specificeret i metoden, skyldes tilstedeværelsen af konjugerede dien- og triensystemer. Disse absorptioner er udtrykt som specifikke ekstinktioner E 1 % 1 cm (ekstinktionen for en 1 % opløsning af fedtstoffet i det angivne opløsningsmiddel i et 1 cm tykt væskelag), sædvanligvis betegnet ved K, (også kaldet ekstinktionskoefficienten).

1. OMRÅDE

Metoden beskriver fremgangsmåden til udførelse af en spektrofotometrisk undersøgelse af fedtstoffer ved ultraviolet lys.

2. METODENS PRINCIP

Fedtstoffet opløses i det specificerede opløsningsmiddel, og opløsningens ekstinktion bestemmes så ved de fastsatte bølgelængder i forhold til rent opløsningsmiddel. De specifikke ekstinktioner beregnes ud fra aflæsningerne på spektrofotometeret.

3. APPARATUR

3.1. Et spektrofotometer til måling af ekstinktion i ultraviolet lys mellem 220 og 360 nm, med mulighed for aflæsning ved hver hele nanometer.

3.2. Firkantede kvartskuvetter med låg, med en optisk vejlængde på 1 cm. 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 målekolber.

3.4. En kromatografisøjle med en længde på 540 mm og en diameter på 35 mm, med et udløbsrør med en diameter på ca. 10 mm.

4. REAGENSER

4.1. Isooctan (2,2,4-trimethylpentan) af spektrofotometrikvalitet med en transmittans på ikke mindre end 60 % ved 220 nm og ikke mindre end 95 % ved 250 nm i forhold til destilleret vand, eller

— cyclohexan af spektrofotometrikvalitet med en transmittans på ikke mindre end 40 % ved 220 nm og ikke mindre end 95 % ved 250 nm i forhold til destilleret vand, eller

— et andet egnet opløsningsmiddel, som kan opløse fedtstoffet fuldstændigt (f.eks. ethanol til ricinusolie).

4.2. Basisk aluminiumoxid til søjlekromatografi, tilberedt og kontrolleret som beskrevet i appendix 1.

4.3. n-hexan til kromatografi.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. Prøven skal være fuldstændig homogen og fri for urenheder i suspension. Olier, som er flydende ved stuetemperatur, filtreres på papir ved en temperatur på ca. 30° C; faste fedtstoffer homogeniseres og filtreres ved en temperatur på højst 10° C over smeltepunktet.

5.2. Ca. 0,25 g af den således forberedte prøve afvejes nøjagtigt i en 25 ml målekolbe, der fyldes op til mærket med det angivne opløsningsmiddel, og opløsningen homogeniseres. Den fremkomne opløsning skal være fuldstændig klar. I modsat fald filtreres hurtigt på papir.

5.3. En kuvette fyldes med opløsningen, og ekstinktionerne måles ved en passende bølgelængde mellem 232 og 276 nm med opløsningsmiddel som reference.

De aflæste ekstinktionsværdier skal ligge inden for området 0,1—0,8. Gør de ikke det, gentages målingerne, idet der benyttes mere koncentrerede eller mere fortyndede opløsninger.

5.4. Når bestemmelse af en specifik ekstinktion skal ske efter passage over aluminiumoxid, går man frem på følgende måde: 30 g basisk aluminiumoxid opslæmmet i hexan hældes på kromatografisøjlen. Efter at adsorbenten har bundfældet sig, tappes den overskydende hexan af, indtil overfladen er ca. 1 cm over aluminiumoxidet.

10 g af fedtstoffet, homogeniseret og filtreret som beskrevet (5.1), opløses i 100 ml hexan, og opløsningen hældes på søjlen. Eluatet opsamles, og alt opløsningsmiddel dampes af under vakuum ved en temperatur under 25° C.

Man går straks videre som beskrevet i (5.2) med dette fedtstof.

6. ANGIVELSE AF RESULTATERNE

6.1. Man opgiver den specifikke ekstinktion (ekstinktionskoefficient) ved de forskellige bølgelængder, som beregnes efter:

$$K_\lambda = \frac{E_\lambda}{c \times s}$$

hvor:

K_λ = den specifikke ekstinktion ved bølgelængden λ

E_λ = den ekstinktion, der er målt ved bølgelængden λ

c = opløsningens koncentration i g/100 ml

s = kuvettens tykkelse i cm.

Resultaterne angives med to decimaler.

6.2. Spektrofotometrisk analyse af olivenolie i henhold til den officielle metode, der er angivet i EF-forordningerne, kræver bestemmelse af den specifikke ekstinktion i isooctanopløsning ved bølgelængderne 232 og 270 nm samt bestemmelse af ΔK, som er givet ved:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

hvor K_m er den specifikke ekstinktion ved bølgelængden m, den bølgelængde på ca. 270 nm der giver maksimal absorption.

APPENDIX I

Tilberedning af aluminiumoxidet og kontrol af dets aktivitet

A 1.1. Tilberedning af aluminiumoxidet

Aluminiumoxid, som på forhånd er tørret i en ovn ved 380—400° C i 3 timer, anbringes i en beholder, der kan lukkes hermetisk, hvorefter der tilsættes 5 ml destilleret vand pr. 100 g aluminiumoxid, og beholderen lukkes øjeblikkeligt. Den rystes flere gange og får så lov til at stå i mindst 12 timer før brugen.

A 1.2. Kontrol af aluminiumoxidets aktivitet

En kromatografisøjle med 30 g aluminiumoxid klargøres. Efter fremgangsmåden i afsnit (5.4) lader man en blanding, der består af:

— 95 % jomfruolie med en specifik ekstinktion på under 0,18 ved 268 nm

— 5 % jordnødolie, der er behandlet med blegejord ved raffineringen, og som har en specifik ekstinktion på ikke under 4 ved 268 nm,

passere gennem søjlen.

Hvis blandingen efter passage gennem søjlen har en specifik ekstinktion på over 0,11 ved 268 nm, er aluminiumoxidet acceptabelt; hvis ikke må hydratiseringsgraden øges.

APPENDIX II

Kalibrering af spektrofotometeret

A 2. Udstyret skal kontrolleres med regelmæssige mellemrum (mindst hver sjette måned), både for korrekt bølgelængde og for udslagets nøjagtighed.

A 2.1. Bølgelængden kan kontrolleres ved hjælp af en kviksølvlampe eller med egnede filtre.

A 2.2. Ved kontrol af fotocellens og fotomultiplikatorrørets respons går man frem på følgende måde: 0,2 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. Man overfører præcis 25 ml af denne opløsning til en 500 ml målekolbe og fortynder op til mærket med den samme kaliumhydroxidopløsning.

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 ± 0,005.

BILAG X A

GASKROMATOGRAFERING AF FEDTSYREMETHYLESTERE

1. FORMÅL

Denne standard giver generelle retninglinjer for gaskromatografisk bestemmelse med pakket kolonne eller kapillarkolonne af den kvalitative og kvantitative sammensætning af en blanding af fedtsyremethylestere fremstillet i henhold til bilag X B.

Metoden gælder ikke for polymeriserede fedtsyrer.

2. REAGENSER

2.1. Bæregas

Inaktiv gas (nitrogen, helium, argon, hydrogen etc.) vel tørret og indeholdende mindre end 10 mg oxygen/kg.

Note 1: Hydrogen, der kun benyttes som bæregas, når det gælder kapillarkolonner, gør det muligt at foretage analysen dobbelt så hurtigt, men indebærer en risiko. Der forefindes sikkerhedsanordninger.

2.2. Hjælpegasser

2.2.1. Hydrogen (renhedsgrad ≥ 99,9 %), fri for organiske urenheder.

2.2.2. Luft eller oxygen, fri for organiske urenheder.

2.3. Referencestandard

En methylesterblanding af rene fedtsyrer eller methylesterne af et fedtstof, der så vidt muligt har samme sammensætning som det fedtstof, der skal analyseres.

Iltning af polyumættende fedtsyrer må undgås.

3. APPARATUR

Instruktionerne angår det sædvanlige udstyr til gaskromatografering med pakket kolonne og/eller kapillarkolonne og flammeionisationsdetektor. Alt udstyr, som kan give den i 4.1.2. definerede ydeevne og opløsning, kan anvendes.

3.1. Gaskromatograf

Gaskromatografen skal omfatte følgende elementer:

3.1.1. Injektionssystem

Der benyttes enten et injektionssystem

a) med pakkede kolonner med det mindst mulige dødvolumen (i dette tilfælde skal injektionssystemet kunne opvarmes til en temperatur, som er 20—50° C højere end kolonnens) eller

b) med kapillarkolonner, hvor injektionssystemet skal være specielt udformet til anvendelse med sådanne kolonner. Injektoren kan være med eller uden split.

Note 2: Er der ikke tale om fedtsyrer med mindre end 16 kulstofatomer, kan der benyttes injektor med faldende nål (moving needle injector).

3.1.2. Ovn

Ovnen skal være i stand til at opvarme kolonnen til en temperatur på mindst 260° C og holde den valgte temperatur inden for 1° C, når der er tale om en kapillarkolonne. Det sidste krav er særlig vigtigt, da der benyttes et rør af sintret kvarts.

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

3.1.3. Pakket kolonne

3.1.3.1. Kolonnen skal være kontrueret af et materiale, som er inaktivt i forhold til de stoffer, der skal analyseres (dsv. glas eller rustfrit stål), af følgende dimensioner:

a) Længde: 1—3 m. En relativt kort kolonne anvendes ved tilstedeværelse af langkædede fedtsyrer (over C_{20}). Ved analyse af syrer med 4 eller 6 kulstofatomer anbefales det at anvende en kolonne på 2 m.

b) Indre diameter: 2—4 mm.

Note 3: Ved tilstedeværelse af polyumætterde forbindelser med mere end tre dobbeltbindinger er der risiko for, at de nedbrydes i en kolonne af rustfrit stål.

Note 4: Der kan anvendes et system med to pakkede kolonner.

3.1.3.2. Fyldmateriale bestående af følgende elementer:

a) *Bærer:* kiselgur, syrevasket og silanbehandlet, eller andet egnet inaktivt bæremateriale med et snævert kornstørrelsesinterval (25 µm i området 125 µm—200 µm), idet middelværdien vælges efter kolonnens indre diameter og længde.

b) *Stationær fase:* polær væske af polyestertype (f.eks. diethylenglycolpolysuccinat, butandiolpolysuccinat, ethylenglycolpolyadipat mv.), cyanosiliconer eller enhver anden væske, der giver den krævede kromatografiske adskillelse (4). Den stationær fase bør udgøre 5 % (m/m)—20 % (m/m) af fyldmaterialet. En ikke-polær fase kan anvendes til visse adskillelser.

3.1.3.3. Konditionering af kolonnen

Efter at kolonnen om muligt er adskilt fra detektoren, opvarmes ovnen gradvis til 185° C, og en strøm af inaktiv gas ledes gennem den netop fremstillede kolonne med en hastighed på 20—60 ml/min. i mindst 16 timer ved denne temperatur og derpå i 2 timer ved 195° C.

3.1.4. Kapillarkolonne

3.1.4.1. 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 0,2 mm og 0,8 mm. Den indvendige overflade skal undergå en passende behandling (f.eks. forbehandling, deaktivering), inden den stationære fasebelægning påføres. En længde på 25 m er tilstrækkelig i de fleste tilfælde.

3.1.4.2. Stationær fase: normalt af typen polyglycol [poly(ethylenglycol) 20 000], polyester (butandiolpolysuccinat) eller polær polysiloxan (cyanosiliconer). Bundne (tværbundne) kolonner er velegnede.

Note 5: Der er risiko for, at polære polysiloxaner gør det vanskeligt at identificere og adskille linolensyre og C_{20} syrer.

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

3.1.4.3. 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 isotermiske betingelser.

Note 6: Korrekt prækonditionerede kolonner fås i handelen.

3.1.5. Detektoren skal helst kunne opvarmes til en temperatur, som er højere end ovnens.

3.2. **Injektionssprøjte**

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

3.3. **Skriver**

Hvis den optegnede kurve skal anvendes til at beregne sammensætningen af den analyserede blanding, skal skriveren være et meget præcist elektronisk instrument, som er foreneligt med det anvendte apparatur. Skriveren skal have følgende specifikationer:

a) responstid mindre end 1,5 sek. og helst 1 sek. (responstiden er den tid, der forløber, fra skriveren modtager et pludseligt signal på 100 %, og indtil den giver et udslag på 90 %)

b) papirbredde: minimum 20 cm

c) papirhastighed: regulerbar fra 0,4—2,5 cm/min.

3.4. **Integrator**

Anvendelse af elektronisk integrator giver en hurtig og præcis beregning. Den skal give et lineært udslag med tilstrækkelig følsomhed, og korrektionen for forstyrrelser på basislinjen skal være tilfredsstillende.

4. FREMGANGSMÅDE

4.1 til 4.3 angår anvendelse af en flammeionisationsdetektor.

Alternativt kan anvendes en gaskromatograf med katarometerdetektor (registrerer ændringer af varmeledningsevne). I så fald ændres arbejdsbetingelserne som angivet i 6.

4.1. **Prøvebetingelser**

4.1.1. Bestemmelse af de optimale arbejdsbetingelser

4.1.1.1. Pakket kolonne

Følgende variabler indgår i valget af arbejdsbetingelser:

a) kolonnes længde og diameter

b) den stationære fases art og mængde

c) kolonnens temperatur

d) bæregassens hastighed

e) den ønskede opløsning

f) prøvens størrelse valgt på en sådan måde, at detektoren og elektrometret i forening giver et lineært udslag

g) analysetiden.

Almindeligvis vil værdierne i tabel 1 og tabel 2 give de ønskede resultater, dvs. for methylstearat mindst 2 000 teoretiske bunde pr. m kolonnelængde og en elueringstid på ca. 15 min.

Hvis apparaturet gør det muligt, skal injektoren have en temperatur på omkring 200° C og detektoren en temperatur, som er lig med eller højere end kolonnes.

Forholdet mellem hydrogenstrømmen til flammeionisationsdetektoren og bæregassens hastighed ligger normalt på 1:2 til 1:1 alt efter kolonnens diameter. Oxygenstrømmen er ca. 5—10 gange større end hydrogenstrømmen.

Tabel 1

Kolonnes indre diameter mm	Bæregassens hastighed ml/min.
2	15—25
3	20—40
4	40—60

Tabel 2

Den stationære fases koncentration % (m/m)	Kolonnens temperatur ° C
5	175
10	180
15	185
20	185

4.1.1.2. Kapillarkolone

Kapillarkolonnens ydeevne og permabilitet er ensbetydende med, at adskillelsen mellem bestanddelene og analysetiden stort set afhænger af bæregassens hastighed i kolonnen. Det vil derfor være nødvendigt at skabe de bedst mulige driftsbetingelser ved ad følge dette parameter (eller blot rette sig efter kolonnens tryktab) alt efter, om man ønsker at opnå bedre adskillelser eller foretage en hurtig analyse.

4.1.2. Bestemmelse af antallet af teoretiske bunde (ydeevne) og opløsning

(Se figur 1).

Analysen gennemføres med en blanding af methylstearat og methyloleat i nogenlunde lige store mængder (f.eks. methylestere af kakaosmør).

Kolonnens temperatur og bæregassens hastighed vælges således, at methylstearattoppens maksimum resistreres ca. 15 min. efter opløsningsmiddeltoppen. Der anvendes en tilstrækkelig mængde af methylesterblandingen til, at methylstearattoppen svarer til ca. $^3/_4$ af fuldt udslag.

Antallet af teoretiske bunde, n (ydeevne), beregnes ud fra formelen:

$$n = \left[16 \times \frac{d_\omega}{\omega_1} \right]^2$$

og opløsningen, R, ud fra formelen:

$$R = \frac{2 \times \Delta}{\omega_1 + \omega_2}$$

hvor

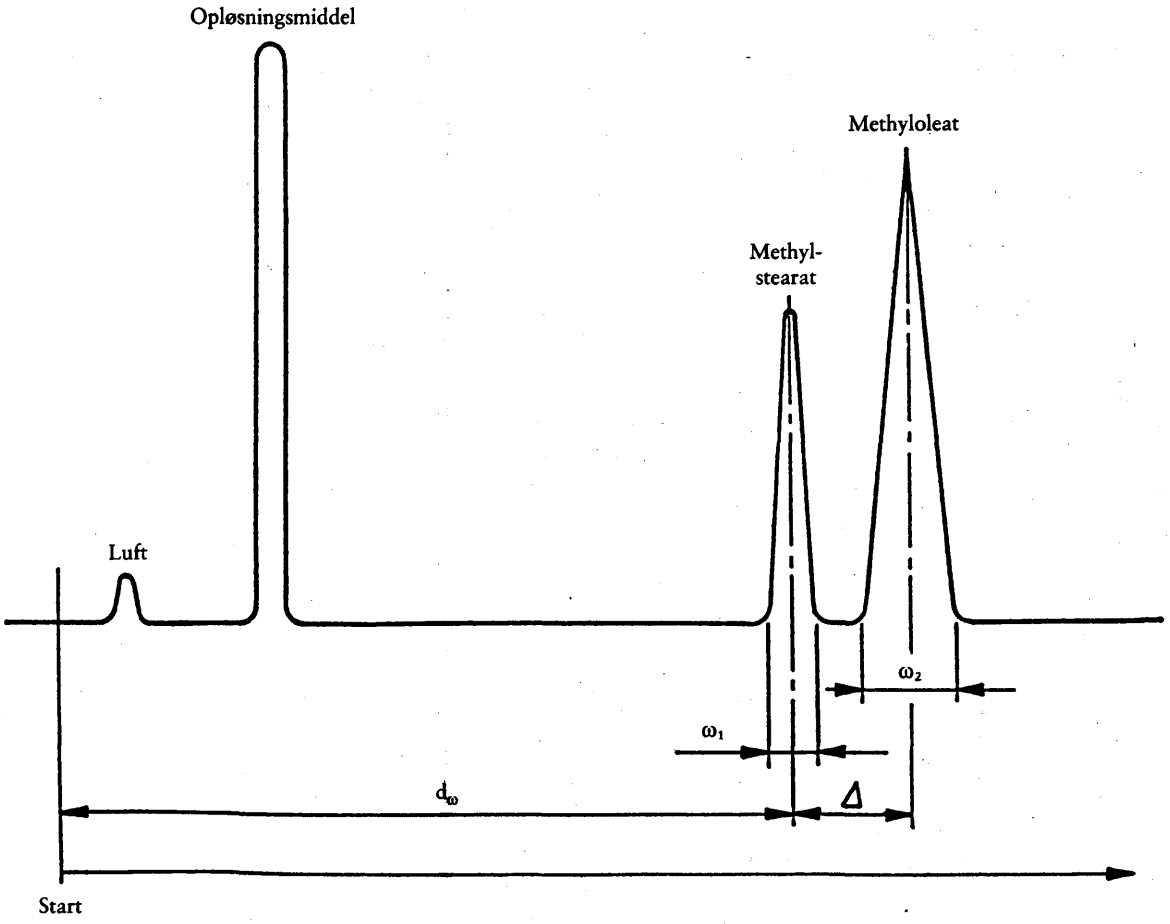
d_ω = retentionsafstanden i mm målt fra kromatogrammets start til det relative maksimum for methylstearattoppen

ω_1 og ω_2 = methylstearat- og methylolealtoppenes bredde i mm målt mellem basislinjens skæringspunkter med kurvens vendetangenter

Δ = afstanden i mm mellem methylstearat- og methyloleattoppenes maksima.

Figur 1

Kromatogram til bestemmelse af antallet af teoretiske bunde (ydeevne) og opløsning



Betingelserne vælges således, at de for methylstearat giver mindst 2 000 teoretiske bunde pr. m kolonnelængde og en opløsning på mindst 1,25.

4.2. **Prøve**

Med injektionssprøjten (3.2) udtages 0,1—2 µl af methylesteropløsningen, der er fremstillet i henhold til bilag X B, og indsprøjtes i kolonnen.

Når det gælder ikke opløste estere, fremstilles i heptan til kromatografi en opløsning på 100 mg/ml, og 0,1—1 µl af denne opløsning indsprøjtes.

Ved analyse af bestanddele, der kun er til stede som spor, kan prøveudtagningen forøges (op til ti gange).

4.3. **Analyse**

Normalt vil driftsbetingelserne være de samme som dem, der er fastlagt i (4.1.1).

Det er dog muligt at arbejde med en lavere kolonnetemperatur, når fedtsyrer med mindre end 12 kulstofatomer skal bestemmes, eller en højere temperatur, når fedtsyrer med mere end 20 kulstofatomer skal bestemmes. Det et muligt at anvende temperaturprogrammering i begge tilfælde. Hvis prøven f.eks. indeholder fedtsyremethylestere med mindre end 12 kulstofatomer, indsprøjtes prøven ved 100° C (eller 50—60° C, hvis der er smørsyre til stede), hvorefter temperaturen straks øges med 4—8° C/min, indtil den optimale temperatur nås. I visse tilfælde kan de to fremgangsmåder kombineres.

Efter den programmerede opvarmning fortsættes elueringen ved konstant temperatur, indtil alle bestanddelene er elueret. Hvis apparatet ikke arbejder med programmeret opvarmning, arbejdes der med to faste temperaturer mellem 100° C og 195° C.

Om nødvendigt anbefales det at foretage en analyse på to stationære faser med forskellig polaritet for at sikre sig, at der ikke forekommer maskerede toppe, hvilket kan være tilfældet ved samtidig tilstedeværelse af $C_{18:3}$ og $C_{20:0}$ eller af $C_{18:3}$ og $C_{18:2}$ konjugeret.

4.4. **Udarbejdelse af referencekromatogrammet og referencediagrammer**

Referencestandardblandingen (2.3) analyseres under de samme driftsbetingelser som for prøvens vedkommende, og retentionstiderne eller retentionsafstandene for de tilstedeværende fedtsyrer måles. På semilogaritmisk papir afbildes logaritmen til retentionstiden eller -afstanden mod antallet af kulstofatomer for alle grader af umættethed; under isotermiske betingelser skal de punkter, der repræsenterer ligekædede syrer med samme umættethedsgrad, ligge på rette linjer, der er nogenlunde parallelle.

Det er nødvendigt at undgå betingelser, hvor der fremkommer »maskerede toppe«, dvs. hvor opløsningen er utilstrækkelig til at adskille to bestanddele.

5. ANGIVELSE AF RESULTATER

5.1. **Kvalitativ analyse**

Prøvens methylestertoppe identificeres ud fra diagrammerne, der er udarbejdet i 4.4, om nødvendigt ved interpolation.

5.2. **Kvantitativ analyse**

5.2.1. Bestemmelse af sammensætningen

Bortset fra undtagelsestilfælde anvendes den interne normaliseringsmetode, dvs. det forudsættes, at samtlige bestanddele i prøven er repræsenteret på kromatogrammet, således at toppenes samlede areal udgør 100 % af bestanddelene (total eluering).

Hvis apparaturet omfatter en integrator, anvendes resultaterne fra denne. Hvis ikke, bestemmer man arealet af hver enkelt top ved at multiplicere toppens høje med dens bredde i halv højde og tager i givet fald hensyn til de forsekllige dæmpningsindstillinger under registreringen.

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 top udgør i forhold til summen af arealerne af samtlige toppe, ud fra følgende formel:

$$\frac{A_i}{\sum_{i}^{n} A} \times 100$$

hvor

A_i = arealet af den top, der svarer til bestanddel i

$\sum_{i}^{n} A$ = summen af arealerne af samtlige toppe.

Resultatet anføres med en decimal.

Note 7: I dette generelle tilfælde betragtes resultatet af beregningen, som er baseret på relative arealer, som en vægtprocent. 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, bør der, når man anvender varmeledningsevnedetektorer, eller når den størst mulige præcision er specielt påkrævet, anvendes korrektionsfaktorer for at omsætte bestanddelenes procentvise toparealer til vægtprocent.

Korrektionsfaktorerne bestemmes ved hjælp af et kromatogram af en referenceblanding af methylestere med kendt sammensætning under samme betingelser som for prøvens vedkommende.

For denne referenceblanding udtrykkes vægtprocent bestanddel i ud fra formlen

$$\frac{m_i}{\sum_{i}^{n} m} \times 100$$

hvor

m_i = massen af bestanddel i i referenceblandingen

$\sum_{i}^{n} m$ = summen af masserne af referenceblandingens forskellige bestanddele.

Ud fra referenceblandingens (4.4) kromatogram beregnes procentdelen (areal/areal) af bestanddel i som følger:

$$\frac{A_i}{\sum_{i}^{n} A} \times 100$$

hvor

A_i = arealet af den top, der svarer til bestanddel i

$\sum_{i}^{n} A$ = summen af arealerne af samtlige toppe.

Korrektionsfaktoren beregnes derpå som:

$$K_i = \frac{m_i \times \sum_{i}^{n} A}{A_i \times \sum_{i}^{n} m}$$

Almindeligvis sættes korrektionsfaktorerne i relation til K_{C16}, så de relative faktorer bliver:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

For prøven er mængden af hver bestanddel i, udtrykt i vægtprocent methylestere,

$$\frac{K'_i \times A_i}{\sum_{i}^{n} (K'_i \times A_i)} \times 100$$

Resultatet anføres med en decimal.

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 4 og 6 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.

Vægtprocent bestanddele i, udtrykt som methylestere, betemmes ud fra formlen

$$\frac{m_s \times K'_i \times A_i}{m \times K'_s \times A_s} \times 100$$

hvor

A_i = arealet af den top, der svarer til bestanddel i

A_s = arealet af den top, der svarer til den interne standard

K'_i = korrektionsfaktoren for bestanddel i (i forhold til K_{C16})

K'_s = korrektionsfaktoren for den interne standard (i forhold til K_{C16})

m = massen i mg af prøven

m_s = massen i mg af den interne standard.

Resultaterne anføres med en decimal.

6. SÆRLIGE TILFÆLDE – ANVENDELSE AF KATAROMETERDETEKTORER (REGISTRERER ÆNDRINGER AF VARMELEDNINGSEVNE)

En gaskromatograf med detektor, der registrerer ændringer af varmeledningsevne (et katarometer) kan også anvendes til bestemmelse af den kvalitative og kvantitative sammensætning af en blanding af fedtsyremethylestere. I så fald ændres betingelserne i (3) og (4) som vist i tabel 3.

Til kvantitativ analyse anvendes korrektionsfaktorerne i (5.2.2.2).

Tabel 3

Variabel	Værdi/betingelse
Kolonne	Længde: 2—4 m Indre diameter: 4 mm
Bærer	Kornstørrelse mellem 160 og 200 µm
Mængde stationær fase	15 % (m/m) – 25 % (m/m)
Bæregas	Helium eller i mangel heraf hydrogen med lavest mulige indhold af oxygen
Hjælpegasser	Ingen
Indsprøjtningstemperatur	40—60 °C højere end kolonnens temperatur
Kolonnens temperatur	180—200 °C
Bæregassens hastighed	Normalt mellem 60 og 80 ml/min.
Indsprøjtet prøvemængde	Normalt mellem 0,5 og 2 µl

7. PRØVERAPPORT

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

Rapporten skal indeholde alle oplysninger, der er nødvendige for en nøjagtig identifikation af prøven.

BILAG X B

FREMSTILLING AF FEDTSYREMETHYLESTERE I OVERENSSTEMMELSE MED BILAG VI, PUNKT I OG II, TIL FORORDNING (EØF) Nr. 72/77 ELLER I OVERENSSTEMMELSE MED DEN NEDENFOR BESKREVNE METODE

FORORD

Metodevalget afhænger af det pågældende fedtstofs fedtsyresammensætning og surhedsgrad og af gaskromatograferingen, der skal foretages.

Nærmere bestemt

— skal der anvendes forseglede glas eller dimethylsulfat til fedtstoffer, der indeholder fedtsyrer med mindre end 12 kulstofatomer

— skal der anvendes methanolsaltsyre eller dimethylsulfat til fedtstoffer med en surhedsgrad på over 3 %

— skal der anvendes natriummethylat eller dimethylsulfat til gaskromatografering af transisomerer

— skal der anvendes methanol-hexan-svovlsyre til fremstilling af methylestere af små mængder fedtstoffer, der er adskilt ved hjælp af tyndtlagskromatografi.

Man kan se bort fra ikke-forsæbelige stoffer, hvis mængde ikke overstiger 3 %. I modsat fald må methylesterne fremstilles af fedtsyrerne.

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Der beskrives fem metoder til fremstilling af methylestere af fedtstoffer:

A: med natriummethylat

B: med natriummethylat i et forseglet glas

C: med methanolsaltsyre i et forseglet glas

D: med dimethylsulfat

E: med methanol-hexan-svovlsyre.

Metode A

2. PRINCIP

Fedtstoffet, der analyseres, opvarmes med tilbagesvaling med methanol og natriummethylat. Methylesterne ekstraheres med ethylether.

3. APPARATUR

3.1. 100 ml slibekolbe med svaler med et natriumhydroxidrør i toppen.

3.2. 50 ml måleglas.

3.3. 5 ml målepipette med 0,1 ml inddeling.

3.4. 250 ml skilletragte.

3.5. 200 ml kolbe.

4. REAGENSER

4.1. Vandfrit methanol.

4.2. En opløsning af ca. 1 % natriummethylat i methanol. Den fremstilles ved, at 0,34 g natrium opløses i 100 ml vandfrit methanol.

4.3. Diethylether.

4.4. 10 % natriumchloridopløsning.

4.5. 40—60° C petroleumsether.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. I 100 ml kolben anbringes 2 g fedtstoffet, som først er blevet tørret over natriumsulfat og filtreret. Der tilsættes 35 ml methanol, svaleren påsættes, og blandingen koges med tilbagesvaling nogle få minutter.

5.2. Opvarmningen standses, svaleren fjernes, og der tilsættes hurtigt 3,5 ml natriummethylatopløsning. Svaleren påsættes igen, og blandingen koges med tilbagesvaling i mindst 3 timer. Methyleringen er komplet, når alt fedtstoffet er opløst, og reagensblandingen er helt klar ved stuetemperatur.

5.3. Reagensblandingen afkøles og hældes i en 250 ml skilletragt, der tilsættes 35—40 ml diethylether, 100 ml vand og 5—6 ml 10 % natriumchloridopløsning. Blandingen omrystes og henstår, til lagene er adskilt. Den vandige fase overføres til en anden skilletragt og ekstraheres på ny med 25 ml diethylether.

50 ml 40—60° C petroleumsether tilsættes de samlede etherekstrakter. Vandet skilles da ud og kan fjernes.

Etherfasen skylles tre gange med 10—15 ml vand, tørres over natriumsulfat og filtreres gennem papir, idet filtratet opsamles i 200 ml kolben.

Opløsningsmidlet destilleres, og processen afsluttes over et vandbad i en strøm af rent nitrogen.

Metode B

2. PRINCIP

Fedtstoffet, der analyseres, behandles med natriummethylat i en methanolopløsning i et forseglet glas ved 85—90° C.

3. APPARATUR

3.1. Et solidt glas til forsegling med en kapacitet på ca. 5 ml (højde 40—45 mm, diameter 14—16 mm).

3.2. 1 ml målepipette med 0,1 ml inddeling.

4. REAGENSER

4.1. En opløsning på ca. 1,5 % natriummethylat i methanol. Den fremstilles ved, at 0,50 g natrium opløses i 100 ml vandfrit methanol.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. I glasset anbringes 2 g af fedtstoffet, som først er blevet tørret over natriumsulfat og filtreret. Der tilsættes 0,3 g (ca. 0,4 ml) natriummethylopløsning, og glasset varmeforsegles.

5.2. Glasset neddyppes i 2 timer ved 85—90° C. Det omrystes med mellemrum. Esterificeringsprocessen er afsluttet, når glassets indhold er klart, efter at glycerinet og reagensresterne har bundfældet sig.

5.3. Der afkøles til stuetemperatur. Glasset åbnes, når methylesterne skal bruges. De kræver ikke yderligere behandling, før de indføres i gaskromatografen.

Metode C

2. PRINCIP

Fedtstoffet, der analyseres, behandles med methanolsaltsyre i et forseglet glas ved 100° C.

3. APPARATUR

3.1. Et solidt glas til forsegling med en kapacitet på ca. 5 ml (højde 40—45 mm, diameter 14—16 mm).

3.2. 1 og 2 ml kalibrerede pipetter.

4. REAGENSER

4.1. En opløsning af saltsyre i 2% methanol. Den fremstilles af chlorbrinte og vandfrit methanol (note 1).

4.2. Hexan til gaskromatografering.

Note 1: Det er nemt at fremstille små mængder chlorbrinte i laboratoriet ved simpel uddrivning fra handelsopløsningen (d = 1,18) ved tildrypning af koncentreret svovlsyre (d = 1,84). Den frigjorte chlorbrinte tørres nemt ved, at man lader den boble gennem koncentreret svovlsyre. Da saltsyre meget hurtigt absorberes af methanol, anbefales det at træffe de sædvanlige forholdsregler, når man opløser den, f.eks. lede chlorbrinten igennem en lille omvendt tragt, hvis rand lige netop rører væskens overflade. Store mængder methanolsaltsyreopløsning kan fremstilles på forhånd, da den holder sig fint i flasker, der er forsynet med glasprop og opbevares i mørke.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. I glasset anbringes 2 g fedtstoffet, som først er blevet tørret over natriumsulfat og filtreret, og 2 ml saltsyremethanolopløsning tilsættes. Glasset varmeforsegles.

5.2. Glasset neddyppes ved 100° C i 40 minutter.

5.3. Glasset afkøles under rindende vand, åbnes, og 2 ml destilleret vand og 1 ml hexan tilsættes. Blandingen centrifugeres, og hexanfasen, som er klar til brug, fjernes.

Metode D

2. PRINCIP

Fedtstoffet, der analyseres, forsæbes med en opløsning af kaliumhydroxid i methanol og behandles derpå med dimethylsulfat. Når der tilsættes saltsyre, udskilles de methylestere, der har dannet sig, automatisk. Der opnås meget rene methylestere ved efterfølgende behandling med aluminiumoxid.

3. APPARATUR

3.1. Et solidt reagensglas med en kapacitet på ca. 20 ml med 10/19 glasslib og slibklemmer.

3.2. 5-kammersvalere med 10/19 glasslib.

3.3. Sintrede glasfiltre, størrelse G 2, 20 mm diameter.

3.4. Spidsbundet reagensglas med en kapacitet på ca. 10 ml.

3.5. 1 ml og 5 ml sprøjter.

4. REAGENSER

4.1. Kaliumhydroxid, 10% opløsning i methanol til gaskromatografering.

4.2. Grøn bromkresolindikator, 0,50% opløsning i methanol.

4.3. Dimethylsulfat (d = 1,335 ved 15° C).

4.4. Koncentreret saltsyre, d = 1,19, fortyndet i forholdet 1:1 med methanol til gaskromatografering.

4.5. Brockman aluminiumoxid til adsorbtionskromatografi.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. I 20 ml reagensglasset anbringes ca. 2,2 ml af fedtstoffet, som først er blevet tørret over natriumsulfat og filtreret. Der tilsættes 5 ml kaliumhydroxidopløsning og nogle få kvartskorn for at kontrollere kogningen. Svaleren påsættes, der opvarmes ved lavt blus i 5 minutter under omrystning. Forsæbningen er afsluttet, når opløsningen er klar. Til slut afkøles under rindende vand, og svaleren fjernes.

5.2. Der tilsættes 2 dråber af indikatoren og ved hjælp af en sprøjte langsomt 1 ml dimethylsulfat. Reagensglasset forsegles hermetisk og omrystes i 2—3 minutter, idet reagensglassets bund neddyppes i et kogende vandbad med hyppige mellemrum. Reaktionen er afsluttet, når indikatoren skifter fra blåt til gult. Til slut afkøles reagensglasset under rindende vand, der åbnes, og der tilsættes 5 ml af saltsyre-methanolopløsningen.

5.3. Efter omrystning i nogle få sekunder sættes reagensglasset på skrå, og der bankes let på det. Dette hjælper med at bringe methylesterne op til overfladen i form af en olieagtig masse (note 2).

Methylesterne fjernes med en sprøjte og anbringes i et spidsbundet reagensglas, der tilsættes en mængde aluminiumoxid svarende til ca. $^1/_4$ af methylestermængden, omrystes og filtreres på filtrerpapir.

Note 2: Hvis methylesterne ikke udskiller sig spontant, tilsættes reagensglasset 5 ml vand, og der omrystes.

Metode E

2. PRINCIP

Fedtstoffet, der analyseres, opvarmes med tilbagesvaling med methanol-hexan-svovlsyre. Methylesterne ekstraheres med petroleumsether.

3. APPARATUR

3.1. Reagensglas med glasslib og med en kapacitet på ca. 20 ml forsynet med en ca. 1 m lang luftsvaler.

3.2. 5 ml kalibreret pipette.

3.3. 50 ml skilletragt.

3.4. 10 ml og 25 ml måleglas.

3.5. 15 ml spidsbundet reagensglas.

4. REAGENSER

4.1. Methyliseringsreagens: vandfri methanol-hexan-koncentreret svovlsyre (d = 1,84) i forholdet 75:25:1 (v/v/v).

4.2. 40—60° C petroleumsether.

4.3. Vandfrit natriumsulfat.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. Stoffet, der er taget fra pladen, anbringes i 20 ml reagensglasset, og der tilsættes 5 ml methyliseringsreagens.

5.2. Svaleren påsættes, og der opvarmes i 30 minutter i et kogende vandbad (note 3).

5.3. Blandingen overføres kvantitativt til en 50 ml skilletragt ved hjælp af 10 ml destilleret vand og 10 ml petroleumsether. Der omrystes kraftigt, og blandingen henstår, til faserne adskilles, den vandige fase fjernes, og etherlaget skylles to gange med 20 ml destilleret vand. Skilletragten tilsættes en lille mængde vandfrit natriumsulfat, der omrystes, blandingen henstår i nogle få minutter og filtreres, idet filtratet opsamles i et 15 ml spidsbundet reagensglas. Opløsningsmidlet afdampes over et vandbad med en strøm af nitrogen.

Note 3: For at kontrollere kogningen indsætter man en glasstang i reagensglasset og begrænser vandbadets temperatur til 90° C.

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. Apparatur 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 hjælpeluftart: 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 akkuratesse 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 ækivalente.

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.

BILAG XII

ORGANOLEPTISK VURDERING AF JOMFRUOLIE

1. FORMÅL

Formålet med denne metode er at fastlægge de nødvendige kriterier for vurdering af jomfruolies duft- og smagsegenskaber (»flavour«) og at udvikle den nødvendige metodologi for vurderingen.

2. ANVENDELSESOMRÅDE

Den beskrevne metode er kun anvendelig til den organoleptiske vurdering og klassifikation af jomfruolie, der kan bruges til direkte fortæring. Den begrænser sig til klassifikation af jomfruolien efter en numerisk skala i relation til opfattelsen af dens duft- og smagsstimuli efter et skøn udøvet af en gruppe udvalgte smagere, der arbejder som et panel.

3. ALMINDELIG GRUNDORDLISTE FOR SENSORISK ANALYSE

Der henvises til »Sensorisk analyse: almindelig grundordliste«.

4. SPECIEL ORDLISTE FOR OLIVENOLIE

Agurk: duft og smag, der fremkommer, når en olie er pakket hermetisk i for lang tid, især i blikbeholdere, og som tilskrives dannelsen af 2,6-nonadienal.

»Atrojado« (muggen): karakteristisk lugt og smag ved olie, der er udvundet af oliven, der er opbevaret i bunker, og som har nået et fremskredet stadium af gæring.

Bitter: karakteristisk smag ved olier, der er udvundet af grønne oliven eller oliven, der er lige ved at skifte farve. Den kan være mere eller mindre behagelig afhængig af intensiteten.

Esparto: karakteristisk lugt og smag ved olie udvundet fra oliven, der er presset i nye måtter af espartogræs. Smagen kan være forskellig, alt efter om måtterne er lavet af grønt eller tørret espartogræs.

Fedtet: lugt af olivenolie, der er ekstraheret i et anlæg, hvor rester af jordolie, fedt eller mineralsk olie ikke er fjernet ordentligt fra maskineriet.

Flad eller glat: duft og smag af olivenolie, hvis organoleptiske karakteristika er meget svage på grund af tabet af dens aromatiske bestanddele.

Frugtagtig: duft og smag, som minder om både lugten og smagen af sund, frisk frugt, plukket på dens optimale modenhedstrin.

Gammel: karakteristisk lugt og smag af olie, der er blevet opbevaret for længe i lagerbeholdere. Kan også forekomme i olie, der har været pakket i overordentlig lang tid.

Grov: en karakteristisk fornemmelse ved visse olier, som, når man smager på dem, giver en tyk, pastaagtig fornemmelse i munden.

Græs: karakteristisk duft og smag ved visse olier, der minder om nyslået græs.

Grønne blade (bitter): duft og smag af olie udvundet af alt for grønne oliven eller oliven, der er blevet knust sammen med blade og kviste.

Grønsagsvand: karakteristisk smag og lugt, som olien får som følge af dårlig dekantering og langvarig kontakt med grønsagsvand.

Harsk: karakteristisk lugt og smag, som er fælles for alle olier og fedtstoffer, der har undergået en auto-oxideringsproces som følge af langvarig kontakt med luften. Denne lugt og smag er ubehagelig og kan ikke korrigeres.

Hø: karakteristisk duft og smag ved visse olier, minder mere eller mindre om tørret græs.

Jordet: karakteristisk lugt og smag ved olie udvundet af oliven, der er opsamlet med jord eller mudder på overfladen, og som ikke er blevet vasket. Kan undertiden være ledsaget af en muggen-fugtig lugt og smag.

Larvebefængt: karakteristisk lugt og smag af olie udvundet af oliven, der har været hårdt angrebet af larver af olivenfluen (Dacus Oleae).

Mandel: denne duft og smag kan forekomme i to former: den, der er typisk for friske mandler, og den, der er særegen for tørrede, sunde mandler, og som kan forveksles med begyndende harskhed. En distinkt smag bemærkes som en eftersmag, når olien forbliver i kontakt med tungen og ganen. Den forbindes med søde olier, der har en flad lugt.

Metallisk: duft og smag, der minder om metal. Karakteristisk for olier, der under uheldige omstændigheder har været i langvarig kontakt med fødevarer eller metaloverflader under knusning, blanding, presning eller opbevaring.

Moden frugt: duft og smag af olivenolie udvundet af modne frugter, den har i almindelighed en lidt flad duft og en sødlig smag.

Mudret bundfald: karakteristisk lugt og smag ved olie, der er udvundet af dekanteret bundfald i kar og underjordiske tanke.

Mug-fugt: karakteristisk lugt og smag af olie udvundet af frugter, hvori store mængder svampe og gær har udviklet sig, fordi de har været opbevaret i adskillige dage i bunker i fugtige omgivelser.

Ophedet eller brændt: karakteristisk lugt og smag af olier, forårsaget af overdreven og/eller langvarig opvarmning under bearbejdningen, især når pastaen blandes termisk, hvis det gøres under uegnede betingelser.

Pressemåtte: karakteristisk lugt og smag af olie fra oliven, der er blevet presset i snavsede pressemåtter, hvori der har været forgærede rester.

Presserester: karakteristisk lugt og smag, der minder om oliven-presserester.

Saltlage: duft og smag af olier ekstraheret fra oliven, der har været konserveret i saltopløsninger.

Skarp: karakteristisk fornemmelse ved visse olier som, når man smager på dem, giver en sammensnerpende reaktion i munden.

Sæbeagtig: lugt og smag, som giver en fornemmelse, der minder om grøn sæbe.

Sød: behagelig smag, som ikke er direkte sukkeragtig, men som findes i olier, hvor de bitre, sammensnerpende og skarpe egenskaber ikke er dominerende.

Vinagtig — eddikeagtig: karakteristisk duft og smag af visse olier, som minder om vin eller eddike. Skyldes hovedsagelig dannelsen af eddikesyre, ethylacetat og ethanol i større mængder end normalt i olivenoliens aroma.

Æble: duft og smag af olivenolie, der minder om denne frugt.

5. GLAS TIL OLIESMAGNING

Der henvises til »Glas til oliesmagning«.

6. PRØVELOKALE

Der henvises til »Vejledning i indretning af prøvelokale«.

7. 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), som indeholder prøverne, mærket med en inskription bestående af to tilfældigt valgte tal eller af to tal og bogstaver. Mærkningen skal foretages med en lugtfri blyant, hvis skrift ikke kan slettes

— urglas med identiske mærker til at dække glassene med

— klassificeringsskema (se figur 2), med brugsanvisning

— blyant eller pen

— små bakker med æble skåret i skiver

— et glas vand ved stuetemperatur.

8. METODOLOGI

Dette afsnit forudsætter de nødvendige forkundskaber til at udføre den sensoriske analyse af jomfruolie, og det forsøger at standardisere den adfærd og den metode, som forventes af de smagere, der deltager i sådanne prøver, og som må være opmærksomme på både de generelle og de specifikke anbefalinger for smagning af olivenolie.

8.1. De pligter, der påhviler panelets organisator eller tilsynsførende

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

Organisatoren skal være ansvarlig for at føre en fortegnelse over apparaturet og for at sikre, at det er tilstrækkelig rengjort, for at tilberede og kode prøverne og for at præsentere dem for smagerne i overensstemmelse med forsøgsplanen, samt for at indsamle de opnåede data og behandle dem statistisk, så de bedste resultater opnås med den mindste anstrengelse.

Den opgave, der påhviler den tilsynsførende, kræver sensorisk færdighed, omhu ved forberedelsen og tilrettelæggelsen af prøverne, og dygtighed og tålmodighed ved planlægningen og udførelsen af prøverne. Det er den tilsynsførendes opgave at stimulere paneldeltagernes moral ved at anspore deres interesse, nysgerrighed og konkurrenceånd. 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 også være ansvarlig for at træne, udvælge og overvåge smagerne for at konstatere, om de lever op til et passende niveau med hensyn til dygtighed.

8.2. Testbetingelser

8.2.1. Prøvens størrelse

Hvert glas skal indeholde 15 ml olie.

8.2.2. Testtemperatur

De olieprøver, der skal undersøges, skal opbevares i glas ved 28° C ± 2° C. Denne temperatur er valgt, fordi det er den bedste temperatur til at observere organoleptiske forskelle ved, ved normal temperatur, når olier bruges som krydderi. En anden faktor, der taler for denne værdi, er, at ved lavere eller højere temperaturer vil enten de aromatiske komponenter næppe fordampe, eller der vil dannes flygtige komponenter, der er specielle for ophedede olier.

8.2.3. 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 og især deres kriterier for, hvad de foretrækker eller kan acceptere.

9. SMAGERE

De personer, der skal virke som smagere ved organoleptiske bedømmelser af oliven-spiseolie, skal trænes og udvælges 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 (se afsnit herom).

Der kræves 8 — 12 smagere til en test; det er dog klogt at holde nogle ekstra smagere i reserve, så de kan gå ind i tilfælde af fravær.

9.1. Generelle anbefalinger for kandidater og smagere

Disse anbefalinger gælder kandidaternes og smagernes adfærd under arbejdet.

Når en smager indkaldes af panelets organisator for at deltage i en organoleptisk test, bør han være i stand til at møde på den forud fastsatte tid, og han skal overholde følgende regler:

9.1.1. Han skal undlade at ryge i mindst 30 minutter før det tidspunkt, der er fastsat for smagningen.

9.1.2. Han må ikke bruge nogen parfume, kosmetik eller sæbe, hvis duft ville kunne holde sig til tidspunktet for smagningen. Han skal bruge en uparfumeret eller svagt parfumeret sæbe til at vaske hænderne med, og han skal derefter skylle og tørre hænderne så ofte, som det er nødvendigt for at fjerne en eventuel duft.

9.1.3. Han skal faste i mindst en time, før smagningen udføres.

9.1.4. Hvis smageren 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 sit arbejde, skal han underrette den tilsynsførende om det, så han eventuelt kan trække sig tilbage fra testen, eller der kan træffes passende beslutninger, idet man må være opmærksom på den deviation i middelværdierne for resten af panelet, der kan opstå.

9.1.5. Når smageren har opfyldt ovenstående krav, skal han tage plads i den bås, der er tildelt ham, på en så rolig og ordentlig måde som muligt.

9.1.6. Når smageren har taget plads, skal han kontrollere, at han har det rigtige apparatur, og at det er rigtigt arrangeret, og han skal sikre sig, at inskriptionen på glasset svarer til inskriptionen på urglasset.

9.1.7. Smageren skal omhyggeligt læse de instruktioner, der er givet på klassificeringsskemaet, og han må ikke begynde at undersøge prøven, før han føler sig helt sikker på den opgave, han skal udføre. Hvis der opstår nogen som helst tvivl, skal han diskutere vanskelighederne med den tilsynsførende i enrum.

9.1.8. 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, til han har dannet sig et indtryk af den olie, der skal vurderes. Lugtefasen må ikke overstige 30 sek. Hvis han ikke er kommet til nogen konklusion inden for dette tidsrum, skal han hvile en kort tid, før han prøver igen. Når den olfaktoriske test er udført, skal smageren bedømme oliens »flavour«, dvs. det generelle lugte-, smags- og føleindtryk. For at gøre dette skal han tage et lille nip 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 ganen, da det er velkendt, at opfattelsen af de fire primære smagskvaliteter, sødt, salt, surt og bittert, varierer i intensitet over de forskellige områder af tungen og ganen.

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.

At tage korte åndedrag lige efter hinanden, idet luften trækkes ind gennem munden, sætter smageren i stand til ikke blot at sprede prøven ud over hele mundhulen, men også at opfatte de flygtige aromatiske komponenter via den bageste del af næsen.

Følesansen skal også tages i betragtning, Derfor skal letflydenhed, klæbrighed og skarphed eller brod noteres ned, når de observeres, og hvis det kræves til den pågældende test, skal deres intensitet angives kvantitativt.

9.1.9. Når der foretages organoleptisk vurdering af en jomfruolivenolie, må der kun vurderes én prøve ad gangen for at undgå den kontrastvirkning, der kunne opstå, hvis andre prøver skulle smages umiddelbart efter.

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 kan anbefales at bruge et lille stykke æble (ca. 15 g), som, efter at man har tygget det, kan spyttes ud i spytkummen. Derefter skylles munden med lidt vand ved stuetemperatur. Der skal hengå mindst 15 minutter mellem afslutningen af én smagning og påbegyndelsen af den næste.

9.2. **Bedømmelse af kandidater**

Dette stadium skal gennemføres af organisatoren, som personligt skal tale med kandidaterne for at gøre sig fortrolig med deres personlighed og miljø. De fysio-psykologiske krav, som skal opfyldes, er ikke særlig strenge, da teoretisk enhver normal person skulle være i stand til at deltage. Faktorer som køn, alder, specielle vaner (rygning) osv. er nutildags afløst af andre som f.eks. helbred og personlig interesse samt at kandidaten har tid til rådighed til arbejdet.

Under samtalen skal organisatoren forklare kandidaten opgavens art og hvor megen tid det omtrent vil tage. Han skal så samle opløsninger fra kandidaten, der gør det muligt for ham at vurdere kandidatens interesse og motivation samt hvor megen tid han reelt har til rådighed. Følgende spørgeskema kan være til hjælp som reference.

SPØRGESKEMA

De bedes besvare følgende spørgsmål

	Ja	Nej
1) Har De lyst til at blive engageret i arbejdet med dette emne?	☐	☐
2) Mener De, at dette arbejde kan bidrage til at forbedre fødevarers kvalitet på hjemmemarkedet og internationalt?	☐	☐
3) Hvis ja, hvorfor (1)		
4) De må være klar over, at De skal smage olie, når De bliver bedt om det. Er De parat til at gøre det?	☐	☐
5) Har De lyst til at sammenligne Deres evne til at lugte og smage med Deres kollegers?	☐	☐
6) Har De tid til rådighed? Er De tilstrækkelig uafhængig til, at De kan organisere Deres daglige arbejde, som De vil?	☐	☐
7) Hvis De er afhængig af en overordnet, tror De så, at hvis De skal være borte fra Deres sædvanlige arbejde i op til en halv time ved flere lejligheder i nogle dage efter hinanden, at De ville få lov til at gøre det?	☐	☐
8) Ville De være i stand til at indhende den tid, De taber på Deres arbejdsplads ved at deltage i den sensoriske analyse?	☐	☐
9) Mener De, at De burde få et vederlag for dette arbejde?	☐	☐
10) På hvilken måde?		

(1) Beskriv, hvad der vil kunne vindes ved organoleptisk bedømmelse af et eller andet næringsmiddel, eller, hvis De ønsker det, olivenolie.

Organisatoren skal bruge disse oplysninger til at sortere kandidaterne, og han skal afvise dem, der kun viser ringe interesse for denne type arbejde, ikke har tid til rådighed, eller ikke er i stand til at udtrykke sig klart.

9.3. **Bestemmelse af gruppens »gennemsnitlige tærskel« for »karakteristiske egenskaber«**

Udvælg omhyggeligt fire olier, der hver anses for repræsentativ for én af følgende smagsegenskaber: »atrojado« (muggen), vinagtig, harsk og bitter, og som har så stor og klar en intensitet som muligt.

Tag en del af hver olie og forbered prøver, hvis koncentration varierer med en faktor 2, så der opstår flere, stadig svagere fortyndinger efter hinanden, i et passende fortyndingsmiddel, indtil der ikke kan opfattes nogen forskel mellem det glas, der kun indeholder fortyndingsmidlet, og de sidste to eller tre fortyndinger. Det sidste par skal være to glas med fortyndingsmiddel.

Serien kompletteres med glas, der indeholder højere koncentrationer, indtil et samlet antal af otte glas er nået.

Der skal forberedes tilstrækkelige mængder af de forskellige koncentrationer til, at hver kandidat kan få en komplet serie af hver smagsegenskab.

For at fastlægge kandidaternes »gennemsnitlige tærskel« for hver smagsegenskab skal de hver have et glas med 15 ml af én af de forberedte koncentrationer og et glas, der udelukkende indeholder 15 ml af fortyndingsmidlet. Når kandidaten har udført prøven, skal han angive, om indholdet af de to glas er ens eller forskelligt.

Den samme prøve gentages for de øvrige koncentrationer af den smagsegenskab, der er under betragtning.

Antallet af korrekte svar, der opnås fra alle smagerne for hver koncentration, noteres, og dette tal angives som en procentdel af antallet af udførte prøver.

Derefter dannes et koordinatsystem, hvor der på abscisseaksen afsættes de afprøvede koncentrationer i stigende rækkefølge, og på ordinataksen afsættes procentdelen af korrekte svar. Sammenhørende værdier af koncentration og procent korrekte svar afsættes i dette koordinatsystem.

Figur 1 er et praktisk eksempel på denne fremgangsmåde. Detektionstærsklen findes ved at trække en linie fra det punkt på kurven, der svarer til ordinatværdien 75 %, ned på abscisseaksen.

Denne »tærskelkoncentration«, som kan være forskellig for hver oprindelig olie, fordi den afhænger af den tilstedeværende smagsegenskabs intensitet, bør være meget nær den samme for de forskellige grupper af kandidater til de forskellige paneler; den er ikke forbundet med nogen vane eller forkærlighed. Derfor er den et referencepunkt, som er fælles for enhver normal gruppe af mennesker, og den kan bruges til at homogenisere de forskellige paneler udelukkende efter deres følsomhed for lugt og smag.

På grundlag af den tærskelkoncentration, der er opnået for gruppen, går man frem på følgende måde:

Man forbereder en serie af stigende og aftagende koncentrationer på en sådan måde, at »tærskelkoncentrationen« indtager plads nr. 10 på denne skala. Den 11. og 12. koncentration vil naturligvis være mere fortyndede, hvorfor det vil være vanskeligere at opfatte tilstedeværelsen af den olie, der har den valgte smagsegenskab.

Idet man tager C_{10} koncentrationen som udgangspunkt, kan de øvrige prøver tilberedes i henhold til følgende formel:

$C_{10} \times a^n$, hvor a er en konstant, fortyndingsfaktoren, som er lig med 1,5, og n er eksponenten, der varierer mellem 9 og – 2.

Eksempel: Vi forudsætter, at tærsklen for harsk olie er 0,32; C_{10} = 0,32, da a = 1,5, vil serien af prøver have følgende koncentrationer:

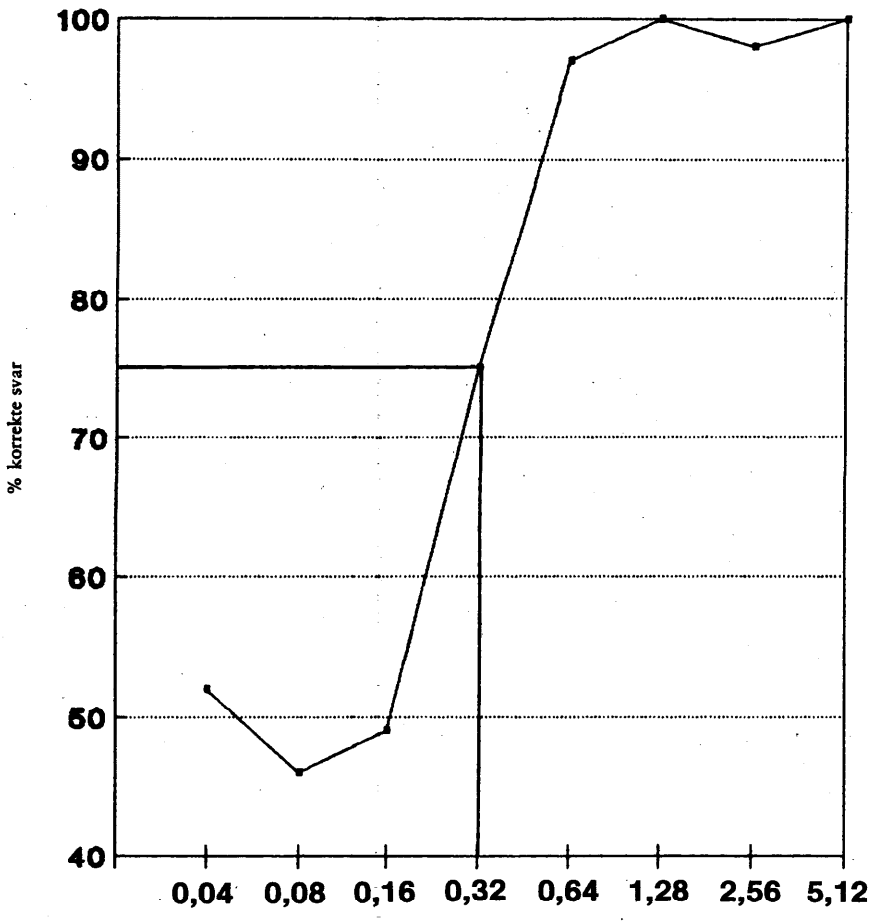
Prøve	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Koncentration	12,30	8,20	5,47	3,65	2,43	1,62	1,08	0,72	0,48	0,32	0,21	0,14

Hvis denne procedure gentages for de tre andre smagsegenskaber på grundlag af deres respektive tærskler, der beregnes som ovenfor angivet, opnås skalaer med lignende aromatiske intensiteter for hver stimulus for alle laboratorier, selv om manglerne ved de oprindelige olier kan være mærkbare ved forskellige intensiteter.

9.4. **Udvælgelse af smagere ved intensitetsvurderingsmetoden**

Ved udvælgelsesproceduren bør der være to-tre gange så mange kandidater, som der kræves til panelet, for at de personer, der har den bedste følsomhed og evne til at skelne, kan udvælges. Det er altid tilrådeligt at anvende det samme produkt som det, der senere skal analyseres (derfor vil olivenolie altid blive anvendt).

Figur 1



Ved valg af metode må man ikke overse, at foruden at være effektiv bør den anvendte fremgangsmåde være så økonomisk som muligt med hensyn til mængden af olie, antallet af prøver, der skal sendes, og den tid, der bruges til udvælgelsen. En udvælgelsesprocedures effektivitet ligger i valget af de optimale niveauer for følgende tre afhængige variable:

a) omkostninger bestemt af antallet af prøver,

b) det forholdsmæssige antal potentielt egnede kandidater, som ved et tilfælde bliver udelukket ved udvælgelsen, og

c) det forholdsmæssige antal kandidater, som ved et tilfælde kommer igennem udvælgelsesprocessen, skønt de ikke er egnede.

Fire punkter af den valgte udvælgelsesprocedure, intensitetsvurderingstesten, som er beskrevet i ASTM (American Society for Testing and Materials), STP (Special Technical Publication) nr. 440, side 53, er blevet modificeret ved:

1) at nedsætte antallet af prøver i serien

2) at udvide rækken af stimuli med henblik på at forøge antallet af olfaktoriske og gustatoriske (lugt- og smags-) noter, som udvælgelsen baseres på, så de tilpasses til de mest almindelige mangler, man finder i olivenolie

3) at variere koncentrationsforholdene i serierne

4) at behandle resultaterne statistisk,

Nødvendigt apparatur

1 500 ml flasker eller glaskolber.

mørke smageglas

prøverør med 10, 15, 1 000 og 1 500 ml inddeling.

Nødvendige produkter

— Merck paraffin (reference 7.160, DAB 8, USP XX) eller fortyndingsmiddel i form af en olie uden lugt eller smag (nyraffineret olivenolie eller anden lignende olie).

— Olier: »atrojado« (muggen), vinagtig, harsk og bitter.

9.4.1. Fremgangsmåde

Efter at have tilberedt fortyndingerne går man videre til udvælgelsen, hvor man begynder med 25 kandidater og prøver dem i overensstemmelse med følgende metodologi for hver stimulus:

1) Man forbereder serier på 12 prøveglas, mærket med en kode (én serie pr. kandidat). 15 ml af hver af de forskellige koncentrationer, der er tilberedt efter formlen $C_{10} \times a^n$, hældes i hver sit prøveglas.

2) Når prøveglassene er blevet fyldt, bør de stå dækket med et urglas i smagelokalet ved en temperatur på 20—22° C i mindst en time, før prøven påbegyndes, for at bringe deres temperatur på niveau med den omgivende temperatur.

3) Organisatoren skal så stille de 12 prøveglas i hver serie op i en række, arrangeret efter aftagende koncentration.

Næste trin er at bede hver kandidat om at udføre prøven på egen hånd efter følgende instruktion:

9.4.2. Instruktion til kandidater

De 12 smageglas, der står på række foran kandidaten, indeholder fortyndinger af ét af de fire stimuli: »atrojado« (muggen), vinagtig, harsk og bitter. Den faktor, der gør det muligt at skelne mellem indholdet af glassene, er lugtens intensitet. Det glas med den mest intense lugt står yderst til venstre, og resten af glassene er placeret i rækkefølge efter aftagende intensitet fra venstre mod højre. Det sidste smageglas til højre kan have så svag en lugt, at det måske er umuligt at opfatte den.

Gå frem på følgende måde: Gør Dem fortrolig med lugten af hvert af glassene i serien. Begynd fra højre (nr. 12), og prøv på at huske alle lugtenes intensitet uden at blive overtræt.

Når De føler, at De er blevet vant til koncentrationsskalaen for lugte, går De ud af lokalet.

I mellemtiden skal organisatoren fjerne ét af glassene i serien og sætte det på niveau med det sidste på højre side og flytte alle de andre, så pladserne til venstre fyldes. De skal så komme tilbage til lokalet og fortsætte med prøven.

Prøven omfatter følgende:

Det smageglas, der er blevet fjernet fra serien, skal sættes tilbage på sin rigtige plads. For at gøre det skal De lugte til det og sammenligne det med de andre så ofte, som De ønsker. De skal huske, at hvis det skal sættes rigtigt på plads, skal det lugte stærkere end prøven umiddelbart til højre for det og svagere end prøven umiddelbart til venstre. Denne prøve vil blive gentaget med tre andre glas.

For at lette prøven og indsamlingen af svarene skal der til hver kandidat udleveres en formular i forbindelse med de instruktioner, der er beskrevet her.

UDVÆLGELSE AF KANDIDATER

Prøve nr. ..... Smagsegenskab .....

Det udtagne glas hører til position nr. .....

Dato ..... Navn .....

9.4.3. Optegnelse af resultater

Organisatoren skal optegne data for hver af kandidaterne på følgende måde:

Kandidatens navn	Studeret smagsegenskab	Tildelt nr. i rækkefølge (K′)	Korrekt nr. i rækkefølge (K)	Bedømmelse $(K'—K)^2$
.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....

9.4.4. Statistisk bedømmelsesprocedure

I dette særlige tilfælde skal de smageglas, der skal sættes tilbage på deres rette plads, være de samme for alle kandidaterne. Ifølge de statistiske beregninger, der er udført til dette formål, skal de svare til følgende positioner i rækkefølgen med hensyn til hver smagsegenskab:

»Atrojado« — muggen (M)	Vinagtig (V)	Harsk (H)	Bitter (B)
Glas nr. (10, 5, 7, 2)	Glas nr. (11, 3, 8, 6)	Glas nr. (7, 4, 10, 2)	Glas nr. (6, 3, 11, 9)

Det nummer, der svarer til glassets position i rækkefølgen, må ikke varieres, da de statistiske beregninger for denne test er udført med henblik på sandsynligheden for, at glassene tilfældigt bliver sat tilbage i deres rigtige positioner.

For i videst muligt omfang at sikre, at oplysninger ikke overgives fra den ene kandidat til den anden, skal organisatoren sikre sig:

1. At der ikke er nogen mulighed for kontakt mellem kandidaterne. Der skal bruges forskellige inskriptioner til hver af kandidaterne.
2. At der ikke er nogen måde, hvorpå kandidaterne kan finde ud af, hvilken position de glas, der er fjernet, havde.
3. Selv om alle kandidaterne skal have forelagt de samme glas som tidligere angivet, skal den rækkefølge, hvori de overrækkes til kandidaten, variere.

Til hver kandidat skal der så gives en karakter, der afhænger af hans udførelse af opgaven på følgende måde:

Lad $e^i_1, e^i_2, \ldots e^i_{12}$ være de 12 glas med de 12 koncentrationer af duft- og smagsegenskaben »i« (i kan være en hvilken som helst af de fire egenskaber »atrojado« — muggen, vinagtig, harsk og bitter), arrangeret efter aftagende intensitet.

Lad e^i_K være ét af de udtagne glas og K′ være den position, som kandidaten giver det, når han sætter det på plads i serien. Værdierne af K og K′ er derfor hele tal mellem 1 og 12 inklusive, svarende til henholdsvis det virkelige pladsnummer for det valgte glas og det pladsnummer, som kandidaten giver det.

Lad T (den maksimale tilladte afvigelse) være en forud fastlagt værdi, som i vort tilfælde er = 3, så at hvis $|K'—K| > T$, bliver kandidaten automatisk vraget (1).

Hvis derimod $|K'—| \leq T$, er kandidaten teoretisk godkendt og kan gå videre med prøven, da han eller hun er i stand til at sætte den pågældende stimulus tilbage til dens rigtige position eller i det mindste meget nær ved den.

I dette tilfælde skal den karakter, der er givet til en kandidat, der har vurderet en bestemt stimulus (koncentration), for eksempel i »atrojado« — muggen serien, være lig med kvadratet på differensen mellem glassets rigtige nummer i rækkefølgen og den position, kandidaten har placeret det i. Det vil sige $P^M_h = (K'—K)^2$.

Da denne operation skal udføres af hver kandidat på fire stimuli (koncentrationer) af hver duft- og smagsegenskab, vil den partielle karakter for egenskaben (f.eks. M) være

$$Z^M = P^M_h + P^M_j + P^M_l + P^M_m$$

Nedenfor er der givet nogle eksempler for at lette foreståelsen af denne operation.

Eksempel 1:

Lad os antage, at de svar, kandidat A har givet for de fire stimuli, der er fjernet fra serien for egenskab (i) er som følger:

Korrekt position for glasset i serien (K)	Position, som kandidaten satte det tilbage i (K′)	Afvigelse fra den korrekte position (K′—K)
7	7	7 − 7 = 0
4	5	4 − 5 = −1
10	6	10 − 6 = 4 (1)
2	4	2 − 4 = −2

(1) Denne kandidat afvises, fordi han har opnået T > 3 i prøven.

(1) Organisatoren bør presse kandidaten til at gå fornuftigt frem, dvs. uden at miste følsomhed på grund af udmattelse af lugtesansen.

Eksempel 2:

Lad os antage, at en kandidat placerer glassene for en bestemt egenskab således:

Korrekt position for glasset i serien (K)	Position, som kandidaten satte det tilbage i (K')	Afvigelse fra den korrekte position (K'—K)
7	7	7 − 7 = 0
4	4	4 − 4 = 0
10	7	10 − 7 = 3
2	3	2 − 3 = −1

Denne kandidat afvises ikke. Han har opnået en karakter på:

$$Z^i = O^2 + O^2 + 3^2 + (-1)^2 = 10$$

Kandidatens endelige karakter, der afgør hans godkendelse eller afvisning som smager, og som afhænger af hans svar på de fire egenskaber, der undersøges, vil blive som følger:

$$P^{M}_{h} + P^{M}_{j} + P^{M}_{l} + P^{M}_{m} = Z^{M}$$
$$P^{V}_{h} + P^{V}_{j} + P^{V}_{l} + P^{V}_{m} = Z^{V}$$
$$P^{H}_{h} + P^{H}_{j} + P^{H}_{l} + P^{H}_{m} = Z^{H}$$
$$P^{B}_{h} + P^{B}_{j} + P^{B}_{l} + P^{B}_{m} = Z^{B}$$

Endelig Z-værdi: $Z = Z^M + ... + Z^B$

hvor: M = »Atrojado« – Muggen
V = Vinagtig
H = Harsk
B = Bitter

Det gælder nu om at afgøre, op til hvilken maksimal værdi kandidaten kan anses for at have et tilstrækkelig højt niveau for opfattelse, hukommelse for lugtindtryk og intellektuel organisation. Det er klart, at Z aldrig kan have en negativ værdi, og at Z = 0 betyder, at kandidaten på korrekt måde har reorganiseret og kvantificeret alle de 16 intensiteter, han har fået forelagt (fire for hver egenskab). Z-værdier, der afviger fra 0, angiver, at kandidaten har genkendt de områder af skalaen, som de valgte intensiteter er taget fra, men inden for disse områder har han været ude af stand til at finde den nøjagtige position, fordi hans evne til at skelne mellem de intensiteter, der er blevet forelagt ham, ikke har været tilfredsstillende.

Det er derfor nødvendigt at bestemme en kritisk værdi (Z_c), således at hvis kandidaten ved et tilfælde skulle sætte alle glassene tilbage inden for de områder, han havde undersøgt i forvejen, har sandsynligheden for at få en slutkarakter Z, der er mindre end Z_c, en tilstrækkelig ringe værdi (α), som kan fastsættes på forhånd. Med andre ord, det må sikres, at sandsynligheden for ved denne procedure at vælge en smager, som ikke har tilstrækkelig evne til at skelne intensiteten af de stimuli, der bruges til udvælgelsesprocessen, er mindre end α.

Når værdien for α er fastsat, (i vores tilfælde til 0,05), fås Z_c af sandsynlighedsdistributionen for den variable Z, som igen afhænger af sandsynlighedsdistributionen for de variable P (K').

Ifølge de relevante statistiske beregninger bliver $Z_c = 34$.

Når Z-værdierne for alle kandidater er udregnet, skal alle kandidater, hvis Z-værdi ligger over 34, udelukkes.

Som eksempel vises Z-værdierne for kandidaterne A og B:

Egenskab	Kandidat A	Kandidat B
»Atrojado« – Muggen (M)	$Z^M = 10$	$Z^M = 12$
Vinagtig (V)	$Z^V = 10$	$Z^V = 11$
Harsk (H)	$Z^H = 10$	$Z^H = 15$
Bitter (B)	$Z^B = 4$	$Z^B = 0$
	$\Sigma = 34$	$\Sigma = 38$

Da de to kandidater har Z-værdier på henholdsvis 34 og 38, vil kandidat A blive godkendt, medens kandidat B vil blive forkastet. Når alle kandidater med en Z-værdi over 34 er blevet elimineret, skal resten klassificeres i henhold til deres Z-værdier, indtil de 12 bedste kandidater er blevet udvalgt.

9.5. **Træning**

Hovedformålene med træningsstadiet er:

a) at gøre smagerne fortrolie med de mange olfaktorisk-gustatorisk-taktile varianter (dvs. varianter, der kan erkendes med lugte-, smags- og følesansen), der findes inden for olivenolier

b) at gøre smagerne fortrolige med den særlige sensoriske metodologi

c) at højne den individuelle evne til at genkende, identificere og kvantificere de sensoriske egenskaber og

d) at forbedre følsomheden og hukommelsen med hensyn til de forskellige smags- og duftegenskaber, så slutresultatet bliver præcise og ensartede vurderinger.

Træningsstadiet omfatter normalt et antal møder afhængig af de muligheder, der står åbne for panelet og studiet. Efter at have analyseret olierne individuelt skal smagerne her diskutere de vanskeligheder, de er stødt på, med organisatoren, og de skal kommentere de givne bedømmelser, så kriterier og meninger kan blive ensartede.

Den standard, der er nået ved træning efter et fastsat antal møder, vurderes ud fra den procentiske forøgelse af nøjagtige svar — hvis der anvendes diskriminatoriske prøver — eller ved at analysere variansen i panelets gennemsnitlige individuelle bedømmelser, når der foretages prøver med brug af en skala.

Den praktiske nytte af denne træningsperiode har været diskuteret frem og tilbage, men for tiden anses den for at være meget effektiv og endog væsentlig, hvis man skal opnå nøjagtige sensoriske data.

9.6. **Præstationskontrol**

Paneler af gamle og erfarne smagere udfører normalt smagninger på en regelmæssig og vedvarende basis, hvad der indebærer sensoriske prøver, som kræver store anstrengelser af dem. Beslutninger af stor teknologisk og kommerciel betydning afhænger i overordentlig mange tilfælde af deres skøn. Derfor bør smagernes præstationer kontrolleres efter udvælgelse og træning for at sikre, at deres resultater er præcise.

Efter at panelerne er sammensat og har gennemgået rutineprøverne, vil det være nødvendigt at kontrollere deres præstationer regelmæssigt med passende mellemrum.

10. FREMGANGSMÅDE VED ORGANOLEPTISK BEDØMMELSE AF JOMFRUOLIE

Når ovenstående standarder er opfyldt, de nødvendige faciliteter til rådighed og panelet udvalgt, skal hver smager lugte til og smage på (1) den olieprøve, der er i smageglasset. Smageren analyserer de olfaktoriske, gustatoriske, taktile og kinæstetiske indtryk ved hjælp af det i figur 2 viste skema. På dette ark optegnes de »noter«, der er til stede, og deres intensitet. Dernæst bedømmes oliens kvalitet.

10.1. **Brug af skemaet i figur 2**

Nogle af de mest karakteristiske lugt- og smagsegenskaber, som hyppigt findes i olivenolie, og som beskriver dens »flavour«, er opført i skemaets venstre side. Hvis smageren finder andre stimuli, der ikke svarer til de anførte beskrivelser, optegnes de under »andet«, idet der bruges en beskrivelser, der definerer dem så nøjagtigt som muligt.

De stimuli, der kan opfattes, vurderes i forhold til deres intensitet, som angives ved et kryds (x) i det tilhørende felt efter følgende kriterier:

1 = knap mærkbar

2 = mindre

3 = middel

4 = stor

5 = meget stor

I skemaets højre side er afsat en skala, der går fra 1 til 9 points (9 for usædvanlig god kvalitet og 1 for den ringeste kvalitet), som smagerne bruger til at give en enkelt, generel bedømmelse af de karakteristika, der er fundet ved den olie, der undersøges. Bedømmelsen skal være i overensstemmelse med de gode punkter og de mangler ved olien, som allerede er anført i skemaets venstre side.

(1) Smageren kan afstå fra at smage, hvis vedkommende finder intenst ubehagelige egenskaber ved lugten; i så fald noteres dette på bedømmelsesskemaet som en eksceptionel hændelse.

Bedømmelsesskemaets første spalte (mangler) er delt op i fem rubrikker. Følgelig skal klassificeringen af olien først og fremmest baseres på det totale fravær af eller tilstedeværelsen af dårligt lugt og smag og på, hvor alvorlige og intense sådanne fænomener er. Da skalaen går op til 9 points, bør der også medregnes visse nuancer eller aspekter, der kan hjælpe til en endelig bestemmelse af den samlede kvalitetsbedømmelse som beskrevet i anden spalte med overskriften »karakteristika«.

10.2. **Endelig bedømmelse**

Den person, der fører tilsyn med panelet, skal indsamle de bedømmelser, der er udført af hver af smagerne. Han skal kontrollere, at de egenskaber og smagsintensiteter, smageren har opfattet og anført på sit profilark, på acceptabel vis modsvarer den værdi, olien er anført til i klassifikationstabellen.

Hvis der er en påfaldende forskel, skal den tilsynsførende bede smageren revidere sit profilark.

Om nødvendigt skal smageren gentage prøven.

Endelig skal den, der fører tilsyn med panelet, udarbejde en tabel med hele panelets bedømmelser og beregne gennemsnittet heraf og standardafvigelsen (for gennemsnittet).

Hvis standardafvigelsen er højere end den metodiske fejl, skal prøven gentages af hele panelet.

Det er kun i tilfælde af analyse i revisionsøjemed, at panelet skal gentage prøverne for at få tre bedømmelser af olieprøven. Den endelige bedømmelse er gennemsnittet af de tre bedømmelser angivet med én decimal.

Hvis gennemsnitsbedømmelsen af bitterhed og/eller skarphed er højere end 2,5, bør olien mærkes tilsvarende, og det bør optegnes, at den er bitter eller skarp.

Angivelse af resultaterne: Den tilsynsførende bestemmer på grundlag af gennemsnitskarakteren den kategori, hvori prøven klassificeres, under hensyntagen til grænserne i bilag I. I analyserapporten oplyses kun om denne kategori.

NB: Olieprøverne bør opbevares i køleskab, indtil de analyseres, og igen anbringes i køleskab, indtil prøven er udført tre gange.

Figur 2

Jomfruolie

Profilskema
Notater om olfaktorisk-gustatorisk-taktile egenskaber

Karakteristika	Opfattelse (2)					
	0	1	2	3	4	5
Oliven-frugtagtig (moden og grøn)						
Æble						
Anden moden frugt						
Grøn (blade, græs)						
Bitter						
Skarp						
Sød						
Andre tilladelige egenskaber						
(Specificer)						
.....						
Sur/vinagtig/eddikeagtig/syre (1)						
Grov						
Metallisk						
Mug/fugt (1)						
Mudret bundfald						
Muggen (»atrojado«)						
Harsk						
Andre utilladelige egenskaber						
(Specificer)						
.....						

(1) Streg det/de ord ud, der ikke gælder.
(2) 0 = manglende (3)
1 = kun lige akkurat mærkbar
2 = let
3 = middel
4 = stor
5 = meget stor
(3) Ved manglende indtryk, marker med »X« i den pågældende kasse.

Bedømmelsesskema

Mangler	Karakteristika	Samlet bedømmelse Points
Ingen	Lugt og smag af oliven Lugt og smag af oliven eller anden frisk frugt	9 8 7
Mindre eller knap mærkbare	Afsvækket lugt og smag, uanset art	6
Mærkbare	Noget mangelfuld lugt og smag eller abnorm lugt og smag	5
Tydelige, på grænsen af det acceptable	Klart mangelfuld, ubehagelig lugt og smag	4
Store og/eller alvorlige, klart mærkbare	Lugt og smag fuldstændigt utilladelige til fortæring	3 2 1

Bemærkninger .....
.....
Smagerens navn .....
.....
Prøvens nr. .....

Dato .....

SENSORISK ANALYSE: ALMINDELIG GRUNDORDLISTE

1. FORMÅL

Formålet med denne standard er at samle de generelle termer, der bruges ved sensorisk analyse, og angive deres definitioner.

2. ORDLISTE

2.1. Almindelig terminologi

Sensorisk analyse (substantiv):

undersøgelse af et produkts organoleptiske egenskaber ved hjælp af sanseorganerne.

Opfattelse (substantiv):

sensorisk bevidsthed om ydre genstande eller begivenheder.

Organoleptisk (adjektiv) (attribut):

beskriver en egenskab ved et produkt, som kan opfattes med sanseorganerne.

Ekspert (substantiv):

(med hensyn til undersøgelse af organoleptiske egenskaber)

smager, som har specialiseret sig i sensorisk analyse af et specifikt produkt og har en grundlæggende forståelse for produktets fremstilling og forbrugernes præference.

Smager (substantiv):

klarsynet, følsom, trænet person, som er udvalgt til at vurdere et næringsmiddels organoleptiske egenskaber med sanseorganerne.

Panel:

gruppe af vurderingsmænd, som er specielt udvalgt og trænet, og som træder sammen for at foretage den sensoriske analyse af produktet under kontrollerede forhold.

Fornemmelse (substantiv):

subjektivt fænomen, der fremkommer som resultat af stimulering af et sanseorgan. Dette fænomen kan skelnes subjektivt eller defineres objektivt ved det involverede sanseorgan, afhængig af stimulus' karakter og intensitet.

Følsomhed (substantiv):

evne til at opfatte en stimulus af ringe intensitet eller små forskelle mellem stimuli, både kvantitativt og kvalitativt ved hjælp af sanseorganerne.

Smagning (substantiv):

arbejde, der omfatter opfattelse, analyse og bedømmelse af et levnedsmiddels organoleptiske egenskaber, især de olfaktoriske, gustatoriske, taktile og kinæstetiske egenskaber, dvs. egenskaber, der kan opfattes med lugte-, smags- og følesansen og muskelfølelsen.

Accept (substantiv):

et individs eller en befolknings velvillige modtagelse af et produkt.

Harmoni (substantiv):

egenskab ved et produkt, som giver anledning til en generel behagelig fornemmelse. Denne fornemmelse fremkaldes af opfattelsen af produktets komponenter som olfaktoriske, gustatoriske, taktile og kinæstetiske stimuli, fordi de er til stede i passende koncentrationsforhold.

Acceptabilitet (substantiv):

tilstand hos et produkt, som modtages velvilligt af et individ eller en befolkning med hensyn til dets organoleptiske egenskaber.

Skelnen (substantiv):

kvalitativ og/eller kvantitativ differentiering mellem to eller flere stimuli.

Kompensation (substantiv):

resultat af vekselvirkningen mellem en kombination af stimuli, således at hver af dem opfattes med mindre intensitet, end hvis den virkede alene.

Aspekt (substantiv):

kombination af organoleptiske egenskaber, der opfattes visuelt: størrelse, form, farve, turbiditet, renhed, fluiditet, skum og mousseren. Denne term bør foretrækkes fremfor termen udseende.

Attribut (substantiv):

en karakteristisk egenskab, som kan opfattes.

2.2. **Fysiologiske termer**

Stimulus (substantiv):

fysisk eller kemisk stof/middel, der fremkalder en specifik respons fra de eksterne eller interne sensoriske receptorer.

Smag (substantiv):

(smagssans)

sans, hvis receptorer er lokaliseret til mundhulen, især på tungen, og som aktiveres af forskellige forbindelser i opløsning.

Gustatorisk (adjektiv):

beskriver den egenskab ved et produkt, der kan aktivere smagssansen ved at vække de fornemmelser, der hører til én eller flere af de fire primære smage: sødt, salt, surt og bittert.

Receptor (substantiv):

specifik struktur i et sanseorgan, som kan vækkes og kan modtage en stimulus og omdanne den til en nerveudladning.

Bemærk: Receptorer klassificeres efter den type energi, der er forbundet med den pågældende stimulus (lys, varme, lyd osv.).

Lugten (substantiv):

lugtesansens funktion med at opfatte og skelne mellem de molekyler, der når den i luftform fra det ydre miljø, direkte eller indirekte gennem næsen.

Intensitet (substantiv):

størrelsen af den energi ved et attribut, der kan måles efter en kvantitativ værdiskala over tærskelværdien.

Tilpasning (substantiv):

midlertidig ændring af følsomheden til opfattelse af sensoriske stimuli på grund af vedvarende, gentagen udsættelse for en given stimulus eller en, der ligner den.

Hæmning (substantiv):

mangel på reaktion fra et sanseorgan eller en del deraf, til trods for, at det bliver udsat for påvirkning fra en egnet stimulus, hvis intensitet er over tærsklen.

Reaktion (substantiv):

handling, hvor de sensoriske celler reagerer på påvirkning fra én eller flere stimuli med relation til et givet sanseorgan.

Krop (substantiv):

berøringsfornemmelse, der opfattes i mundhulen, og som giver en fornemmelse af et produkts tæthed, viskositet, konsistens eller kompakthed.

Vellugt (substantiv):

frisk, behagelig, dejlig duft.

At lugte (verbum):

(aktiv form anvendt på lugt)

beskriver den handling at opfatte en lugt.

Objektiv (adjektiv):

a) beskriver det, der giver en sand fremstilling, som kan verificeres, af genstanden ved at minimere de menneskelige faktorer (f.eks. præference, vane, tilbøjelighed)

b) beskriver den teknik, der enten ved hjælp af sensoriske eller instrumentelle metoder minimerer selvinducerede fejl.

Bemærk: Brugen af termen »instrumentel« som synonym kan ikke tilrådes.

Subjektiv (adjektiv):

beskriver det, der fremkalder en opfattelse, der er påvirket ikke alene af stimulus, men også af vores måde at tænke og føle på.

Muskelfølelse (substantiv):

fornemmelser, der fremkommer som resultat af tryk på prøven frembragt ved bevægelser i mundhulen eller med fingrene (f.eks. ved at trykke på ost med fingrene).

Tærskel (substantiv):

Absolut tærskel:

den mindste værdi af en sensorisk stimulus, der giver anledning til:

— fremkomsten af en fornemmelse (stimulustærskel eller detektionstærskel)

— eller identifikation af fornemmelsen (genkendelsestærskel).

Differenstærskel:

den mindste værdi af en sensorisk stimulus, der giver anledning til en mærkbar forskel i fornemmelsens intensitet.

Terminaltærskel:

den største værdi af en stimulus, over hvilken en forøgelse af intensiteten ikke opfattes.

Præferencetærskel:

den mindste kvantitative værdi af en stimulus eller kritiske overtærskelværdi af den samme stimulus, ved hvilken en tiltræknings- eller afvisningsreaktion fremkommer i relation til en neutral stimulus, f.eks. ved valget mellem en sukkeropløsning og vand.

Bemærk: Der bør skelnes mellem en absolut præferencetærskel og en differential præferencetærskel.

Under-tærskel (adjektiv):

under den absolutte tærskel.

Over-tærskel (adjektiv):

over den absolutte tærskel.

Sensorisk udmattelse:

specifik form for sensorisk tilpasning, hvor der forekommer en nedsættelse af følsomheden.

Kompensation (substantiv):

resultat af en vekselvirkning mellem en kombination af stimuli, således at hver af dem opfattes med mindre intensitet, end hvis den virkede alene.

Synergisk (adjektiv):

samlet effekt eller påvirkning af givne stoffer, hvor intensiteten af de organoleptiske attributter, der fremkommer som et resultat af kombinationen, overstiger summen af intensiteterne af attributterne taget hver for sig.

Kontrastvirkning:

forøgelse af reaktionen på forskelle mellem to stimuli, der optræder samtidig eller lige efter hinanden. Modsat konvergensvirkning.

Konvergensvirkning:

reduktion af reaktionen på forskelle mellem to stimuli, der optræder samtidig eller lige efter hinanden. Modsat kontrastvirkning.

2.3. **Terminologi i relation til organoleptiske egenskaber**

Sur (adjektiv):

a) beskriver den primære smag, der fremkaldes af fortyndede vandige opløsninger af de fleste sure stoffer (f.eks. citronsyre, mælkesyre, vinsyre)

b) beskriver den egenskab ved rene stoffer eller blandinger, som frembringer denne smag.

Det tilsvarende substantiv er surhed.

Sur (adjektiv):

beskriver den lugt- og smagsfornemmelse, hvor de syrer, der generelt fremkommer ved gæring, er fremherskende, samt de næringsmidler, der fremkalder denne fornemmelse.

Nogle faktorer, der bidrager til denne fornemmelse, står i forbindelse med gæring, for eksempel mælkesyregæring eller eddikesyregæring, i et næringsmiddel.

Bitter (adjektiv):

a) beskriver den primære smag, der fremkaldes af fortyndede vandige opløsninger af forskellige stoffer som f.eks, kinin, koffein og visse alkaloider

b) beskriver den egenskab ved rene stoffer eller blandinger, der fremkalder denne smag.

Det tilsvarende substantiv er bitterhed.

Salt (adjektiv):

a) karakteristisk fornemmelse, der opfattes med smagssansen, det mest typiske eksempel herpå fremkaldes af natriumchloridopløsning

b) beskriver den egenskab ved rene stoffer eller blandinger, der fremkalder denne smag.

Det tilsvarende substantiv er salthed.

Sødt (adjektiv):

a) beskriver den primære smag, der fremkaldes af vandige opløsninger af forskellige stoffer som f.eks. sakkarose

b) beskriver den egenskab ved rene stoffer eller blandinger, der fremkalder denne smag.

Det tilsvarende substantiv er sødme.

Astringerende:

a) beskriver den komplekse fornemmelse, der fremkaldes i mundhulen af en fortyndet vandig opløsning af produkter som f.eks. nogle tanniner (garvesyre) (for eksempel kakitannin og slåentannin)

b) beskriver den egenskab ved rene stoffer eller blandinger, der fremkalder denne fornemmelse.

Det tilsvarende substantiv er astringens.

Flavour (substantiv):

»flavour« betyder den kombination af olfaktoriske, gustatoriske, taktile og kinæstetiske fornemmelser, som gør det muligt for en vurderingsmand at identificere og etablere et gunstigt eller ugunstigt kriterium på flere niveauer.

Smag (substantiv):

a) fornemmelse der opfattes, når smagspapillerne stimuleres af opløselige stoffer

b) egenskab hørende til den specifikke fornemmelse, der fremkaldes af sådanne stoffer.

Primærsmag (substantiv):

enhver af de karakteristiske smage, som der menes at være fire af: sødt, salt, surt og bittert.

Lugt (substantiv):

a) kombination af fornemmelser, der opfattes af lugteorganet ved indsnusning af flygtige stoffer

b) egenskab ved den specifikke fornemmelse, der fremkaldes af ethvert af de ovennævnte stoffer.

Aroma (substantiv):

a) behagelige fornemmelser, som opfattes indirekte af lugteorgenet, når man smager på madvarer

b) inden for parfumeriet og i ikke-specialiseret sprog bruges denne term også om de samme fornemmelser opfattet direkte gennem næsen.

Eftersmag, restsmag (substantiv):

kombination af fornemmelser opfattet efter at stimulus er forsvundet fra mundhulen, og som afviger fra de fornemmelser, der opfattedes før.

Aromatisk (adjektiv):

a) beskriver egenskaben ved rene stoffer eller blandinger, som, når de smages, fremkalder de fornemmelser, der kaldes aroma

b) beskriver de produkter, som når de undersøges direkte via næsen, fremkalder fornemmelser af vellugt og friskhed.

Stofvirkning (substantiv):

karakteristika ved et produkts faste eller rheologiske tilstand, som i kombination kan stimulere de mekaniske receptorer under smagningen, især de receptorer, der er lokaliseret til mundhulen.

Bemærk: Denne term refererer udelukkende til de objektive egenskaber, ikke til de fornemmelser, der fremkommer, og som betegnes ved generelle termer som f.eks. konsistens, trævlethed, fedtethed osv.

Mundskylning:

handling, hvorved føde, der er til stede i munden, kommer i kontakt med alle de følsomme områder i munden, så at alle de fornemmelser, den fremkalder, kan opfattes.

Bemærk: Denne ordliste kan udvides ved at studere ISO standard 5492, del I til V, og andre publikationer som f.eks. J. L. Magnens publikation med titlen »Les cahiers techniques du Centre National de Coordination des Études et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation«.

GLAS TIL OLIESMAGNING

1. FORMÅL

Denne standards formål er at beskrive de karakteristiske egenskaber ved de glas, der er beregnet til brug ved den organoleptiske analyse af spiseolier (lugt, smag, flavour).

Desuden beskriver den det varmeaggregat, der er nødvendigt for at nå og opretholde den rette temperatur til denne analyse.

2. BESKRIVELSE AF GLASSET

Tegningen i figur 1 forsøger at fastlægge de optimale karakteristika for et stykke apparatur af denne art, som kan specificeres således:

a) maksimal stabilitet for at forhindre, at glasset vipper og olien spildes

b) en basis, der passer til fordybningerne i varmeaggregatet, så bunden af glasset opvarmes jævnt

c) en form, der er bredest ved basis, så oliens flygtige komponenter let kan frigøres, men som indsnævres ved glassets munding, så de samme komponenter let koncentreres; derved sikres det, at de opfattes og identificeres bedre af næsen

d) glasset er lavet af mørkt glas for at forhindre smageren i at opfatte oliens farve; derved elimineres eventuelle fordomme, og dannelsen af forudfattede meninger eller tendenser hindres.

2.1. Dimensioner

Glasset er skitseret i figur 1, og det har følgende dimensioner:

total kapacitet 130 ml ± 10 ml

total højde 60 mm ± 1 mm

diameter ved munding 50 mm ± 1 mm

diameter på det videste sted 70 mm ± 1 mm

diameter ved basis 35 mm ± 1 mm

glassets tykkelse på siderne 1,5 mm ± 0,2 mm

basis' tykkelse 5 mm ± 1 mm

Hvert glas skal være udstyret med et urglas, hvis diameter skal være 10 mm større end glassets munding. Dette urglas skal bruges som låg for at forebygge tab af aroma og tilgang af støv.

2.2. Fremstillingskarakteristika

Glasene skal være lavet af modstandsdygtigt glas; det skal være mørkt, så indholdets farve ikke kan skelnes, og det skal være frit for ridser og bobler.

Kanten skal være jævn, glat og afrundet.

Glasset skal være hærdet, så det kan tåle de temperaturforandringer, det kommer ud for under prøverne.

2.3. **Brugsanvisning**

Glassene skal rengøres med uparfumeret sæbe eller opvaskemiddel, og de skal skylles flere gange, indtil rensemidlet er fuldstændig fjernet. Den sidste skylning skal være med destilleret vand, hvorefter glassene skal stå og løbe af og derefter tørres i en tørreovn.

Der må hverken benyttes koncentrerede syrer eller blandinger med kromsyre.

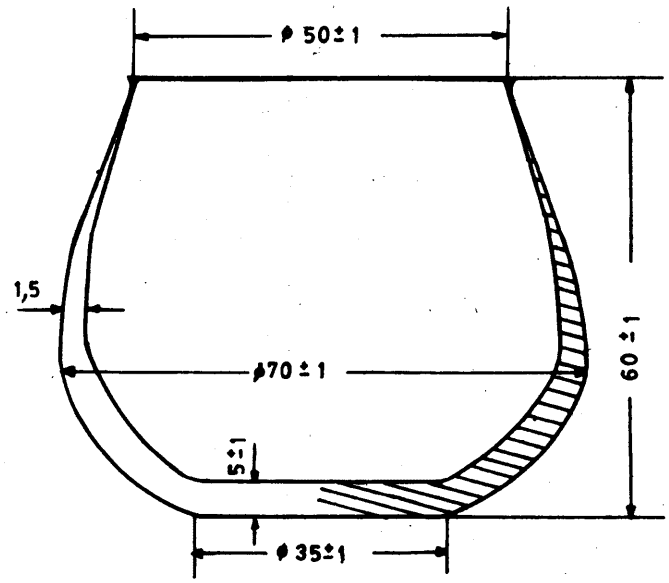
Glassene skal enten stå i ovnen, indtil de skal bruges, eller de skal opbevares i et skab, hvor de skal være beskyttet mod forurening fra eventuel udefra kommende lugt.

Før brugen skal der lugtes til hvert glas for at sikre, at der ikke er nogen udefra kommende lugt til stede. Mens prøven forberedes, skal man sørge for at optegne inskriptionen på hvert glas og hvilken olie, det indeholder. Organisatoren skal være den eneste, der kender denne relation mellem inskription og olie.

3. ANORDNING TIL OPVARMNING AF PRØVER

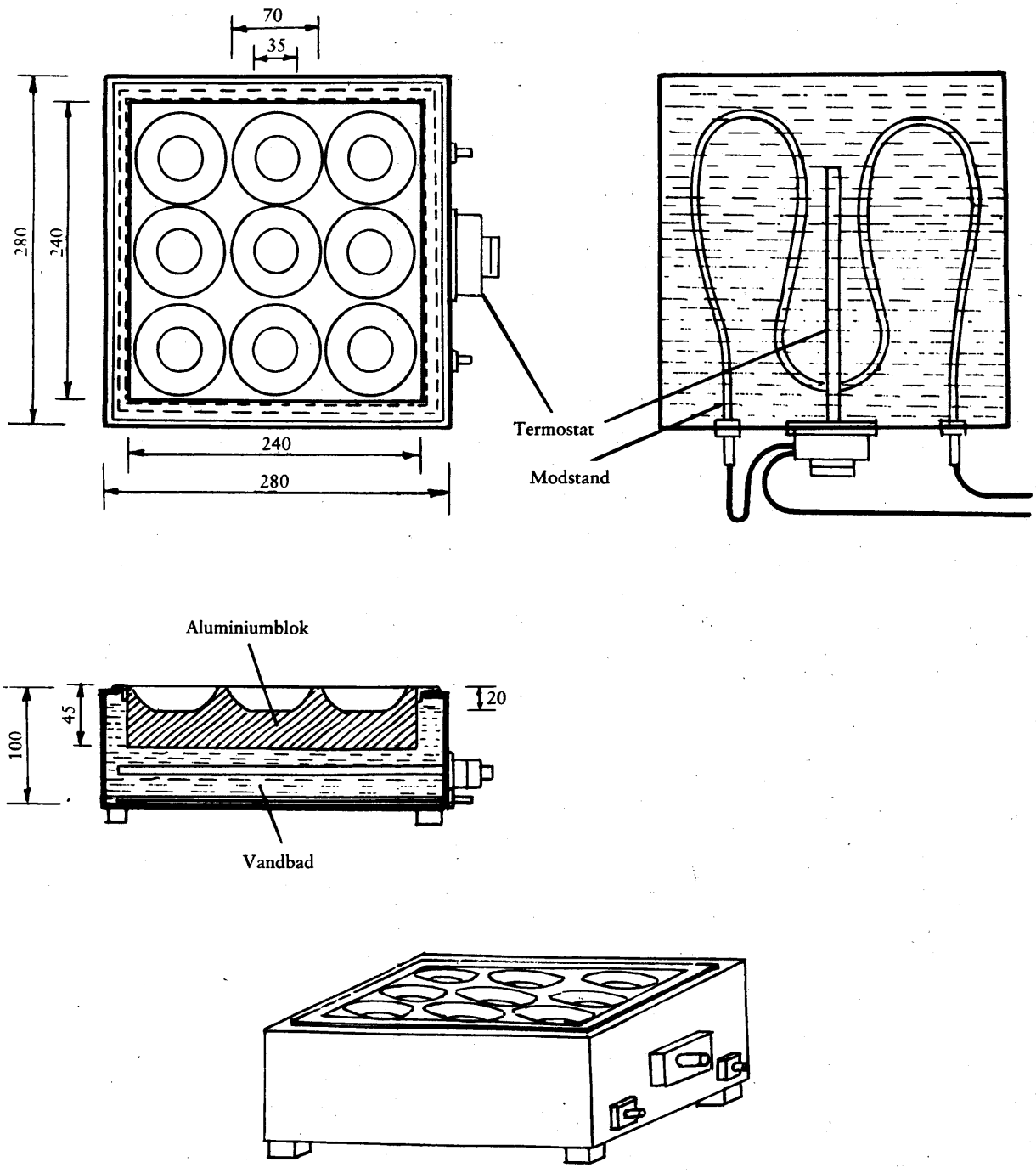
Prøverne skal underkastes organoleptisk undersøgelse ved en fastsat temperatur, som for olier skal være 28 ± 2° C. Til dette formål skal der installeres en opvarmningsanordning (se figur 2) inden for smagerens rækkevidde i hver bås. Den består af en aluminiumblok nedsænket i et termostatreguleret vandbad, hvor der opretholdes en konstant temperatur. Denne blok har en række fordybninger, som glassenes bund passer ned i. Temperaturforskellen mellem opvarmningsanordningen og den olie, der er i de glas, der er indsat i fordybningerne i de forskellige blokke, må ikke være større end ± 2° C.

Figur 1 — *Smageglas*



Dimensioner (i mm)

Figur 2 — *Anordning til opvarmning af prøver (dimensioner i milimeter)*



VEJLEDNING I INDRETNING AF ET PRØVELOKALE

1. INDLEDNING

Prøvelokalet udformes, så det giver det panel, der deltager i de sensoriske prøver, et egnet, behageligt, standardiseret miljø, der letter arbejdet og hjælper med til at forbedre resultaternes repeterbarhed og reproducerbarhed.

2. FORMÅL

Denne standards formål er at specificere de basale betingelser, der skal opfyldes ved indretningen af et prøvelokale.

3. GENERELLE SPECIFIKATIONER FOR INDRETNINGEN

Lokalerne skal, uanset deres størrelse (se 3.1), opfylde følgende specifikationer:

De skal være behagelige og passende oplyst (se 3.2), men i neutral stil. Til dette formål anbefales en beroligende, klar, lys farve til væggene, så der skabes en afslappet atmosfære (1).

Lokalerne skal være lette at rengøre, og de skal være adskilt fra eventuelle støjkilder, derfor skal de helst være lydisolerede. De skal også holdes fri for udefra kommende lugte; derfor skal de, hvis det er muligt, udstyres med effektiv ventilation. Hvis svingningerne i den ydre temperatur gør det nødvendigt, skal prøvelokalet være udstyret med air conditioning for at holde temperaturen tæt på 20—22° C.

3.1. Dimensioner

Lokalernes dimensioner afhænger ofte af laboratoriets eller firmaets muligheder. Generelt bør de være tilstrækkelig rummelige til at muliggøre indretningen af ti båse og et område til tilberedning af prøverne.

Det er dog klart, at jo større et areal, der reserveres til indretning af prøvelokalet, des bedre, da hjælpeområder så kan indrettes, f.eks. til rengøring af apparatur, til kulinariske forberedelser og til samlingssted for åbne paneler.

3.2. Belysning

Den almindelige belysning, hvad enten den kommer fra sollys eller lamper (f.eks. lysstofrør), skal være ensartet, kontrollerbar og diffus.

3.3. Temperatur- og fugtighedsforhold

Lokalerne skal konstant holdes på en behagelig temperatur og under behagelige hygrometriske betingelser. Bortset fra helt specielle omstændigheder anbefales en temperatur på 20—22° C og hygrometriske betingelser på 60—70 % relativ fugtighed.

4. BESKRIVELSE AF BÅSENE

4.1. Almindelige karakteristika

Båsene til sensorisk analyse skal være placeret ved siden af hinanden i lokalerne. De skal være ens, og de skal være adskilt af skillevægge, som skal være tilstrækkelig høje og brede til at isolere smagerne, når de sidder i båsene.

Båsene kan være lavet af et hvilket som helst egnet materiale, som er let at rengøre og vedligeholde (f.eks. træ, glasovertrukket krydsfiner, lamineret træ og lignende). Hvis der benyttes maling, skal den være fuldstændig lugtfri, når den er tør.

Stolene i båsene skal være behagelige, og de skal kunne indstilles i højden.

Hver bås skal også have individuel belysning, hvis retning og intensitet kan indstilles.

Det må stærkt anbefales, at båsene udstyres med en knap, der står i forbindelse med en udvendig lampe, så smageren kan meddele den tjenstgørende udenfor, at han er færdig med prøven, ønsker flere prøver, savner et stykke apparatur, har bemærket en eller anden uregelmæssighed eller har behov for oplysninger osv., uden at distrahere de andre smagere.

(1) Lokalets farveskema og dets belysning kan påvirke resultaterne af den sensoriske analyse.

4.2. **Dimensioner**

Båsene skal være tilstrækkelig store og komfortable. I almindelighed skal de have følgende dimensioner:

— bredde:

0,75 m (uden vask)

0,85 m (med vask)

— længde:

0,50 m (bord)

0,20 m ekstra til skillevæg

— skillevæggenes højde:

mindst 0,60 m fra bord

— bordets højde:

0,75 m.

4.3. **Indretning**

Bordoverfladen skal være let at rengøre.

En del af denne overflade skal benyttes til en vask forsynet med rindende drikkevand. Hvis dette ikke kan lade sig gøre, kan denne plads dog benyttes til en spyttebakke, spytkumme eller lignende.

Når prøverne skal opbevares ved en konstant temperatur over eller under stuetemperatur, mens smagningen forgår, er det tilrådeligt at have en egnet anordning til dette formål (vandbad, varmeplade e.lign.).

Der kan også sættes en hylde op i en højde af ca. 1,10 meter fra gulvet til placering af forskelligt tilbehør (glas, små apparater osv.).

Hvis indretningen af båsene i prøvelokalet gør det muligt, kan det betale sig at installere en anordning til at lette præsentationen af prøverne. Den kan være i form af en skydelem (figur 1), en drejelig lodret anordning, som egner sig til glas eller kopper (høje beholdere) (figur 2), eller en luge, der åbnes horisontalt, når de beholdere, der indeholder prøverne, er små (figur 3). Det er simpelt hen et spørgsmål om at sikre, at åbningen er stor nok til, at bakker og glas med prøver kan passere igennem den.

5. EKSTRA LOKALER

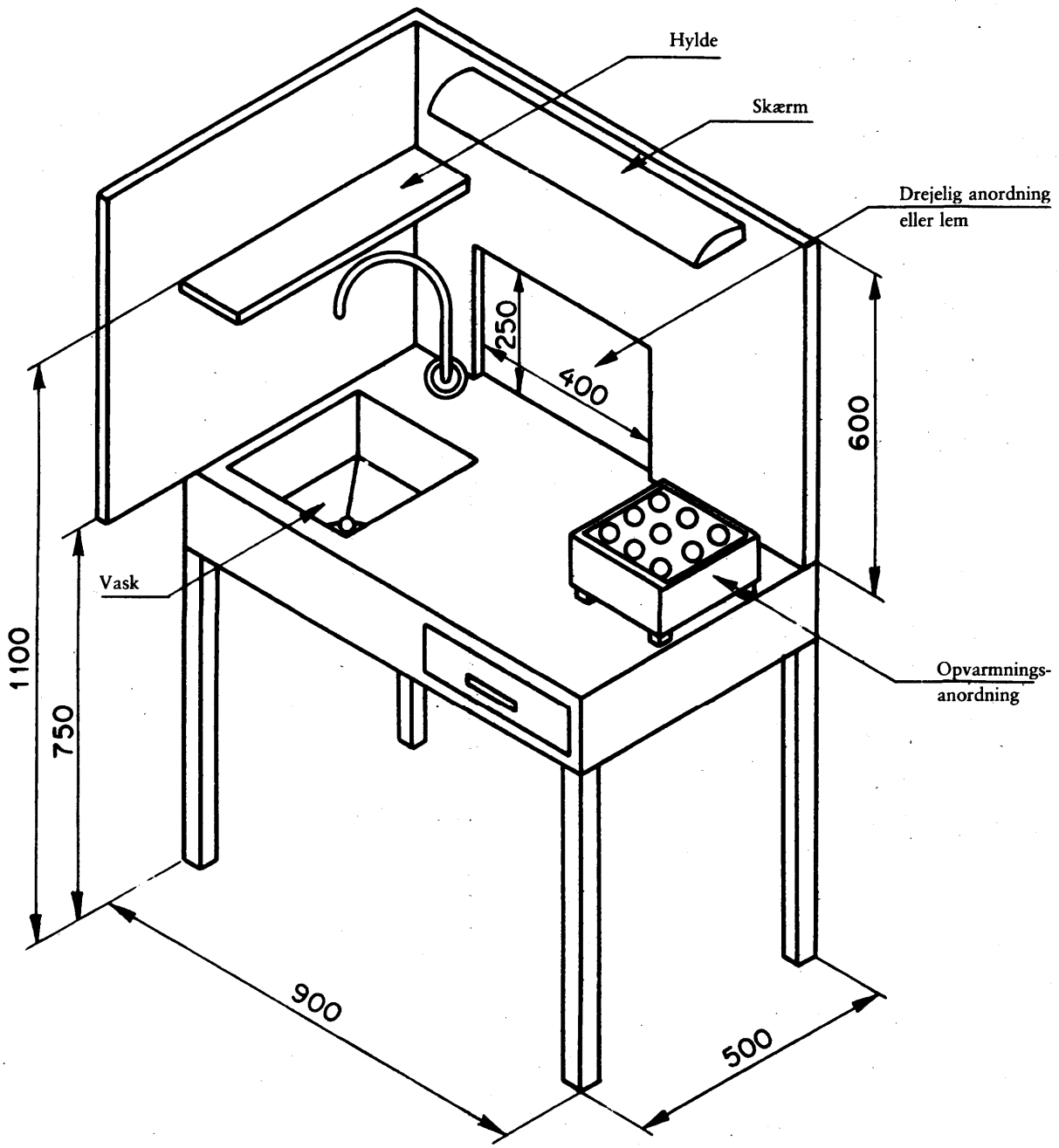
Hvis der er tilstrækkelig plads, er det tilrådeligt at indrette særlige lokaler til tilberedning af prøver (kulinarisk eller på anden måde), til at arrangere glas eller apparatur og til diskussioner før eller efter smagningen. Hvis sådanne lokaler er til rådighed, skal de holdes rene, og lugte, støj eller samtaler fra disse lokaler må på ingen måde forstyrre smagernes arbejde i prøvelokalet.

Et eksempel på et prøvelokale med yderligere lokaler ses på figur 4.

Bemærk: Her er ideelle forhold beskrevet. Hvis det ikke er muligt at holde en sådan installation udelukkende til sensorisk analyse, kan prøverne dog udføres i lokaler, der opfylder de minimumskrav, der her er beskrevet (belysning, temperatur, støj, lugte), ved at der opsættes transportable båse, fremstillet af foldeelementer, således at de i det mindste isolerer smagerne fra hinanden.

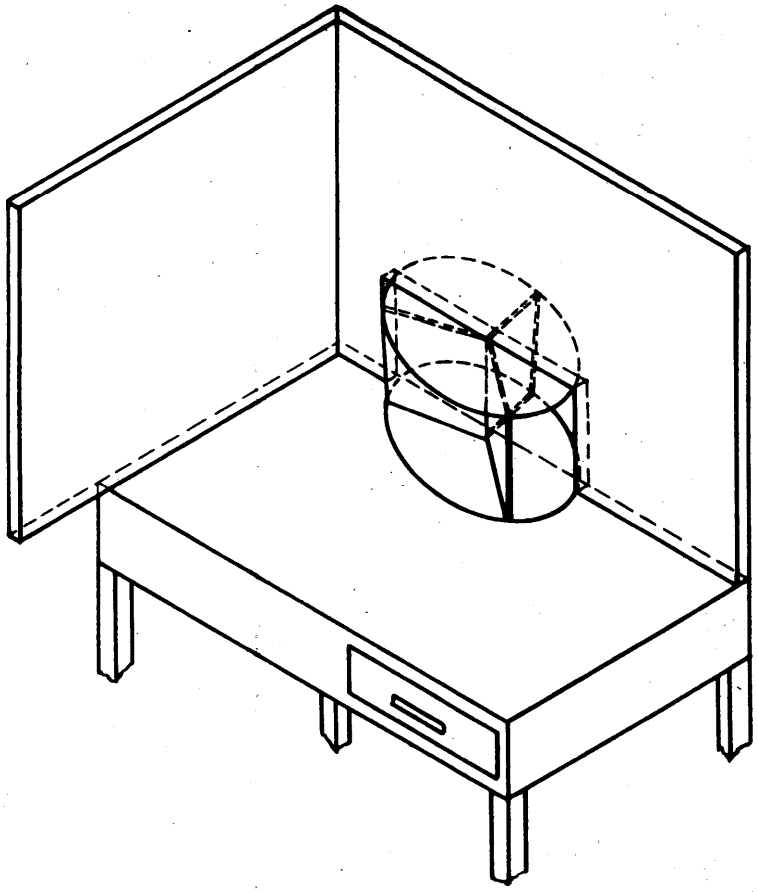
BÅSENS INDRETNING

Figur 1



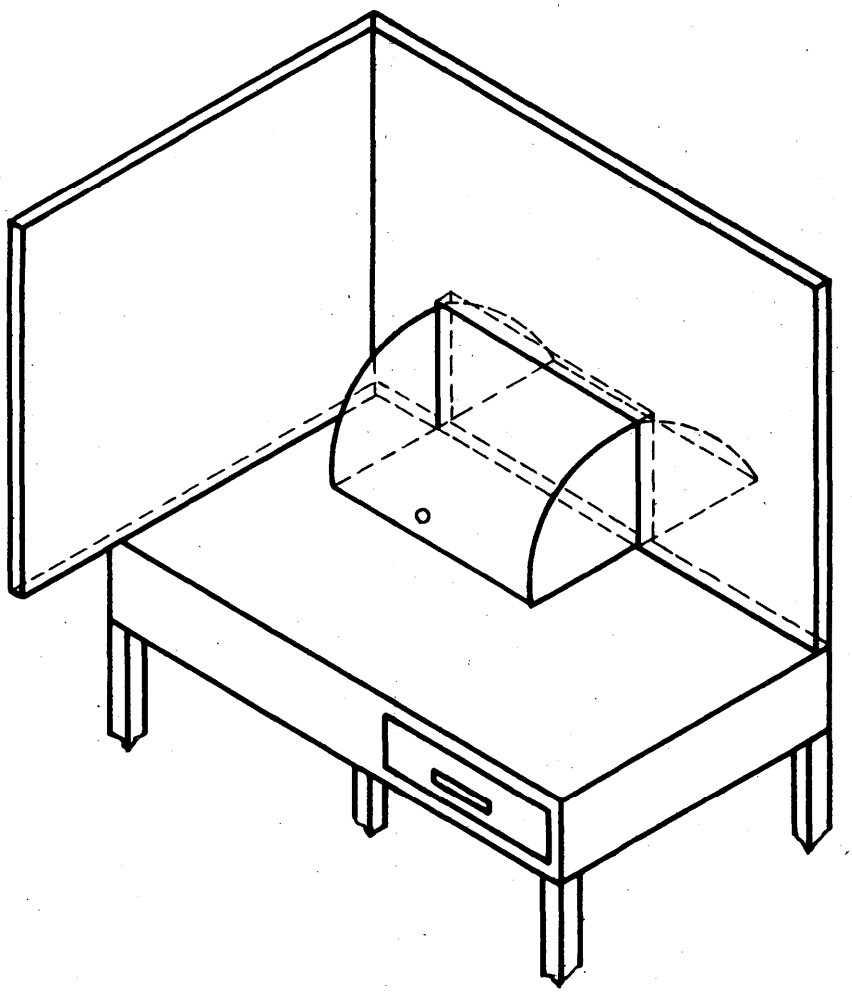
DREJELIG ANORDNING TIL PRÆSENTATION AF PRØVER

Figur 2

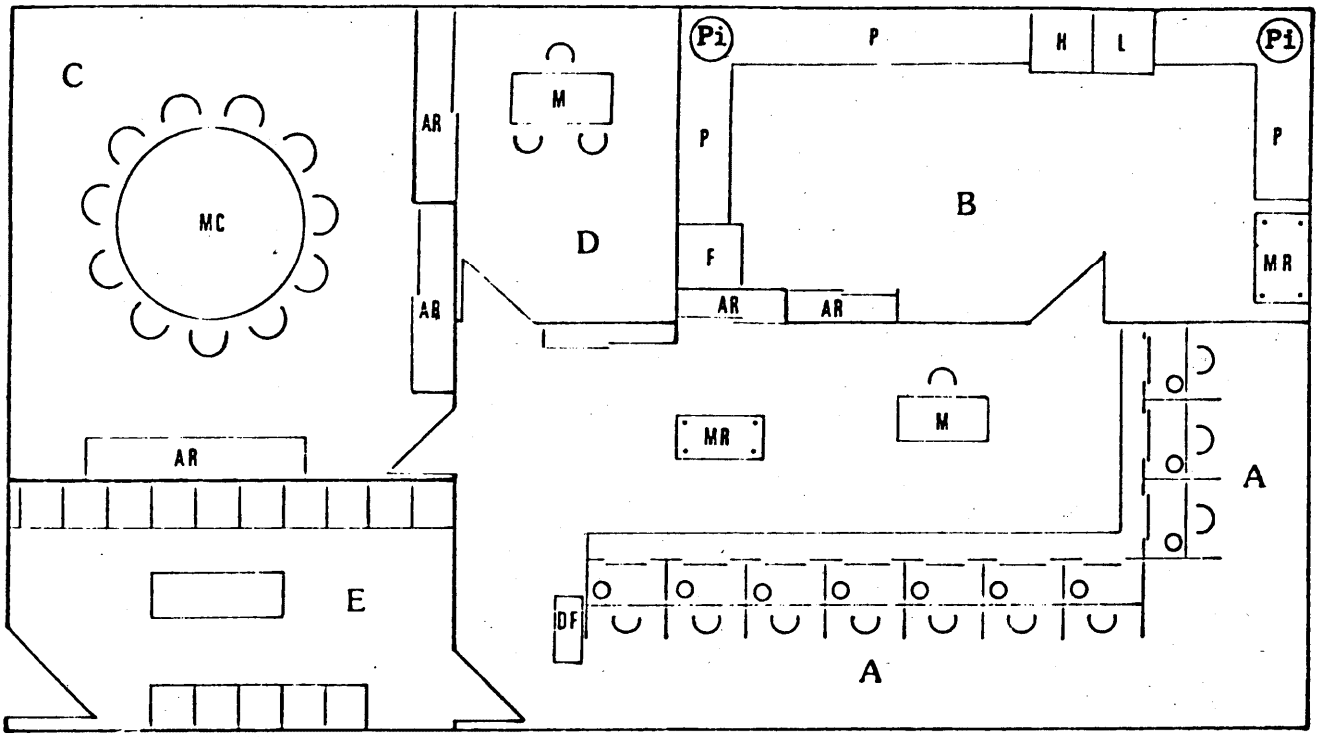


LEM TIL PRÆSENTATION AF PRØVER

Figur 3



Figur 4 — *eksempel på et prøvelokale*



A — Smagebåse
B — Lokale til rengøring af apparatur og forberedelse af prøver
C — Åbent panel
D — Kontor
E — Venteværelse
F — Køleskab
H — Ovn
L — Opvaskemaskine
Pi — Vask
AR — Skab
MR — Rullebord
DF — Uddeling af skemaer
MC — Rundt bord
M — Bord
P — Arbejdsbord

BILAG XIII

RAFFINERINGSBEVIS

1. NEUTRALISATION OG BLEGNING AF OLIVENOLIE I LABORATORIET

1.1. **Neutralisation af olie**

1.1.1. Apparatur

— højt 300 ml bægerglas

— laboratoriecentrifuge med 100 ml reagensglas

— 250 ml bægerglas

— 100 ml kolber

— dekantertragt til 1 liter.

1.1.2. Reagenser

— vandig natriumhydroxidopløsning på 12 %

— ethanolopløsning på 1 % af phenolphtalin

— analyseren hexan

— analyseren isopropylalkohol.

1.1.3. Fremgangsmåde

a) *Olier af en surhedsgrad, udtrykt i oliesyre, på under 30 %*

50 g råolie hældes i et højt 300 ml bægerglas og opvarmes til 65° C i vandbad. Under langsom bevægelse tilsættes en mængde natriumhydroxid på 12 % svarende til oliens indhold af frie fedtsyrer, med et overskud på 5 %. Omrøringen fortsættes i fem minutter, idet der opretholdes en temperatur på 65° C.

Det hele omhældes i 100 ml reagensglas til centrifugering og sæbemassen udskilles ved centrifugering. Den dekanterede olie hældes i et 250 ml bægerglas og vaskes med 50—60 ml destilleret kogende vand, idet det vandholdige lag fjernes ved hjælp af en hævert. Vaskningerne gentages, indtil sporene af sæberester er fuldstændig forsvundet (indtil phenolphtaleinets rosa farve er forsvundet).

Olien centrifugeres for at fjerne de små restmængder af vand.

b) *Olier af en surhedsgrad, udtrykt i oliesyre, på over 30 %*

I en dekantertragt til en liter hældes 50 g råolie, 200 ml hexan, 100 ml isopropylalkohol, og en så stor mængde natriumhydroxidopløsning på 12 %, som svarer til oliens indhold af frie fedtsyrer, med et overskud på 0,3 %. Der omrøres kraftigt i 1 minut. Derefter tilsættes 100 ml destilleret vand; der omrøres på ny, og man lader væsken stå.

Efter lagdelingen lader man det nederste lag, der indeholder sæberne, løbe af. Mellem de to lag (olieholdigt foroven og vandholdigt forneden) dannes der ofte et mellemlag, som består af planteslim og uopløselige stoffer, og som ligeledes skal fjernes.

Derefter vaskes hexanopløsningen af syrefri olie med portioner, bestående af 50—60 ml af en opløsning af isopropylalkohol og destilleret vand i forholdet 1 : 1 (v/d), indtil phenolphtaleinets rosa farve forsvinder. Derpå fjernes hexanet fuldstændigt ved afdestillering i vakuum (for eksempel ved hjælp af en rotationsfordamper).

1.2. **Blegning af den neutraliserede olie**

1.2.1. Apparatur

— 250 ml kolbe med tre slebne halse, der gør det muligt at indsætte:

a) et gradinddelt termometer, der kan aflæses op til 90° C

b) et mekanisk røreapparat med 250—300 omdrejninger i minuttet og udstyret til at fungere i vakuum

c) et forbindelsesstykke til vakuumpumpen

— vakuumpumpe udstyret med manometer og i stand til at give residualtryk på 15—30 milibar.

1.2.2. Fremgangsmåde

I trehalsekolben afvejes ca. 100 g af den neutraliserede olie. Termometret og røreapparatet indsættes; vakuumpumpen tilsluttes og olien opvarmes under omrøring indtil 90° C. Denne temperatur holdes under stadig omrøring, indtil den olie, der skal analyseres, er fuldstændig befriet for sit vandindhold (ca. 30 minutter).

Vakuum brydes og der tilsættes 2 à 3 g aktiveret jord. Vakuum genoprettes, indtil der opnås et residualtryk på 15—30 milibar, og der omrøres stadig ved en temperatur på 90° C i 30 minutter med ca. 250 omdrejninger i minuttet.

Dernæst filtreres ved varme i et termostatisk reguleret tørreskab (50—60° C).

BILAG XIV

SUPPLERENDE BESTEMMELSE NR. 2, 3 OG 4 TIL KAPITEL 15 I DEN KOMBINEREDE NOMENKLATUR

1. *»Bestemmelse 2.A:* Som »olivenolie« (KN-kode 1509 og 1510) betragtes kun olie, som udelukkende er fremstillet af oliven, bortset fra re-esterificeret olivenolie og blandinger af olivenolie med anden olie.

Tilstedeværelsen af re-esterificeret olivenolie eller andre olier påvises ved hjælp af metoderne, der er beskrevet i bilag V, VII, IX, X og XII. De analytiske karakteristika ved sterol- og fedtsyresammensætningen i alle olivenolier i KN-kode 1509 og 1510 er anført i nedenstående tabel.

Fedtsyresammensætning

Tabel I — Syreindhold i %		*Tabel II* — Sterolindhold i %	
Myristinsyre	M 0,1	Kolesterol	M 0,5
Linolensyre	M 0,9	Brassicasterol	M 0,2
Arachinsyre	M 0,7	Campesterol	M 4,0
Eicosansyre	M 0,5	Stigmasterol	≤ Campesterol
Behensyre	M 0,3	β-sitosterol (1)	m 93,0
Lignocerinsyre	M 0,5	Δ-7-stigmasterol	M 0,5

M = maksimum
m = minimum

(1) Δ-5,23-stigmasterol + kolesterol + β-sitosterol + sitostanol + Δ-5-avenasterol + Δ-5,24-stigmastadienol

Bestemmelse 2.B: Som »jomfruolie« betragtes olie, som udelukkende er udvundet af oliven ved mekaniske eller andre fysiske processer under betingelser, især termiske betingelser, der ikke medfører nogen forringelse af olien, og som ikke har undergået anden behandling end skylning, dekantering, centrifugering eller filtrering, men ikke olie, der er udvundet af oliven ved hjælp af opløsningsmidler (KN-kode 1510), jf. punkt I og II nedenfor.

I. Som »bomolie« (KN-kode 1509 10 10), uanset surhedsgrad, betragtes olivenolie med

a) et indhold af alifatiske alkoholer på ikke over 400 mg/kg

b) et erytrodiol- og uvaolindhold på ikke over 4,5 %

c) et indhold af mættede fedtsyrer i 2-stillingen i triglyceriderne på ikke over 1,3 %

d) og/eller et af følgende karakteristika:

— 1) et peroxidtal på over 20 meq O_2/kg

— 2) et indhold af flygtige halogenerede opløsningsmidler på over 0,2 mg/kg i alt og på over 0,1 mg/kg for hvert enkelt opløsningsmiddel

— 3) en ekstinktionskoefficient K_{270}, der er over 0,25, og som efter behandling med aktiveret aluminiumoxid ikke er over 0,11. I så fald skal de efter neutralisation og blegning i laboratoriet have følgende karakteristika:

— en ekstinktionskoefficient K_{270} på ikke over 1,20

— en variation (ΔK) i ekstinktionskoefficienten i bølgelængdeområdet omkring 270 nm på over 0,01, men ikke 0,16

$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$

hvor

K_m = ekstinktionskoefficenten ved bølgelængden for absorptionskurvens maksimum omkring 270 nm

K_{m-4} og K_{m+4} = ekstinktionskoefficienterne ved bølgelængder, der er henholdsvis 4 nm mindre og større end bølgelængden for K_m.

— 4) organoleptiske egenskaber, der indbefatter påviselige mangler, som overstiger grænserne for det acceptable, og en panelbedømmelse, som giver under 3,5 points.

II. Som »jomfruolie« (KN-kode 1509 10 90) betragtes olivenolie med følgende karakteristika:

a) et indhold af frie fedtsyrer, beregnet som oliesyre, på ikke over 3,3 g pr. 100 g

b) et peroxidtal på ikke over 20 meq O_2/kg

c) et indhold af alifatiske alkoholer på ikke 300 mg/kg

d) et indhold af flygtige halogenerede opløsningsmidler på ikke over 0,2 mg/kg i alt og på ikke over 0,1 mg/kg for hvert enkelt opløsningsmiddel

e) ekstinktionskoefficient (ΔK) K_{270}, der ikke er over 0,25 og som efter behandling af olieprøven med aktiveret aluminiumoxid ikke er over 0,10 (1)

f) variation i ekstinktionskoefficienten (ΔK) i bølgelængdeområdet omkring 270 nm på ikke over 0,01

g) organoleptiske egenskaber, som kan indbefatte påviselige mangler inden for grænserne af det acceptable, og en panelbedømmelse, der giver over 3,5 points

h) et erytrodiol- og uvaolindhold på ikke over 4,5 %

i) et indhold af mættede fedtsyrer i 2-stillingen i triglyceriderne på ikke over 1,3 %.

Bestemmelse 2.C: Til KN-kode 1509 90 00 henføres olivenolie, der er fremkommet ved behandling af olivenolier henhørende under KN-kode 1509 10 10 eller 1509 10 90, også blandet med jomfruolie, og som har følgende karakteristika:

a) et syreindhold, beregnet som oliesyre, på ikke over 3,3 g pr. 100 g

b) et indhold af alifatiske alkoholer på ikke over 350 mg/kg

c) en ekstinktionskoefficient K_{270} på over 0,25, men ikke over 1,2, og som efter behandling af olieprøven med aktiveret alumuniumoxid er over 0,10

d) variation i ekstinktionskoefficienten (ΔK) i bølgelængdeområdet omkring 270 nm på over 0,01, men ikke over 0,16

e) et erytrodiol- og uvaolindhold på ikke over 4,5 %

f) et indhold af mættede fedtsyrer i 2-stillingen på ikke over 1,5 %.

Bestemmelse 2.D: Til KN-kode 1510 00 10 henføres »rå olie«, bl.a. olie af presserester, der har følgende karakteristika:

a) et syreindhold, udtrykt som oliesyre, på over 2 g pr. 100 g

b) et erytrodiol- og uvaolindhold på over 12 %

c) et indhold af mættede fedtsyrer i 2-stillingen i triglyceriderne på ikke over 1,8 %.

Bestemmelse 2.E: Til KN-kode 1510 00 90 henføres olier, der er fremkommet ved behandling af olier henhørende under pos. 1510 00 10, også blandet med jomfruolie, og som ikke har de i punkt I og II omhandlede oliers karakteristika, hvis de har et indhold af mættede fedtsyrer i 2-stillingen i triglyceriderne på ikke over 2 %.«

(1) Når K_{270} er over 0,25, foretages en ny bestemmelse efter behandling med aluminiumoxid; K_{270} må ikke overstige 0,10.

2. »*Bestemmelse 3:* KN-kode 1522 00 31 og 1522 00 39 omfatter ikke:

   a) restprodukter fra behandlingen af fedtstoffer og fede olier, som indeholder olie, hvis iodtal bestemt efter metoden i bilag XVI er under 70 eller over 100

   b) restprodukter fra behandlingen af fedtstoffer og fede olier, som indeholder olie, hvis iodtal er mellem 70 og 100, men hvor arealet af den top, der svarer til retentionsvolumenet (retentionstiden) for β-sitosterol, og som er bestemt efter bilag V til den nedenfor nævnte forordning, udgør mindre end 93 % af summen af steroltoppenes arealer.«

3. »*Bestemmelse 4:* Til bestemmelse af ovennævnte karakteristika anvendes de i bilagene til forordning (EØF) nr. 2568/91 beskrevne analysemetoder.«

BILAG XV

1. OLIEINDHOLD I PRESSERESTER AF OLIVEN

1.1. Apparatur

— Egnet 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.

— Ekssikkator.

— 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 tyvendedel 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 %.

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° C ± 2° C og derefter afkølet mindst 1 time i ekssikkatoren, 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 begyndes 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 vejet 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° C ± 2° 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 ekssikkatoren 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 ekssikkator 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:

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

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 vegetabilske 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.

$c(Na_2S_2O_3 \times 5H_2O)$ = 0,1 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.

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

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

hvor

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

V_1 = den numeriske værdi af den til blindprøven benyttede mængde (ml) natriumthiosulfat-standardopløsning (4.4)

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 artimetiske gennemsnit af de to bestemmelser under forudsætning af, at repeterbarhedskravet er opfyldt.