

KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 796/2002

af 6. maj 2002

om ændring af forordning (EØF) nr. 2568/91 om kendetegnene for olivenolie og olie af olivenpresserester og de i den forbindelse anvendte metoder og ændring af de supplerende bestemmelser i bilaget til Rådets forordning (EØF) nr. 2658/87 om told- og statistiknomenklaturen og den fælles toldtarif

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

2568/91 udgå, og en række fejl i teksten til forordning (EØF) nr. 2568/91 bør udbedres.

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

(4) For at harmonisere metoderne til fremstilling af fedtsyremethylestere til analyse af oliernes fedtsyresammensætning er det med den tekniske udvikling i analysemetoderne ud fra oliernes indhold af frie syrer muligt at reducere antallet af metoder i det nugældende bilag X B til to.

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 (EF) nr. 1513/2001 ⁽²⁾, særlig artikel 35a,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 2658/87 af 23. juli 1987 om told- og statistiknomenklaturen og den fælles toldtarif ⁽³⁾, senest ændret ved Kommissionens forordning (EF) nr. 578/2002 ⁽⁴⁾, særlig artikel 9, og

(5) På baggrund af de indhøstede erfaringer har Det Internationale Olivenolieråd udarbejdet en ny metode til bedømmelse af de organoleptiske kendetegn for jomfruolie. Denne metode er mere pålidelig og enkel end den, der for tiden er fastsat i bilag XII til forordning (EØF) nr. 2568/91. Den i bilag XII fastsatte metode bør derfor erstattes af den nye metode til organoleptisk vurdering af jomfruolie.

ud fra følgende betragtninger:

(1) 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 ⁽⁵⁾, senest ændret ved forordning (EF) nr. 2042/2001 ⁽⁶⁾, fastsætter fysiske, kemiske og organoleptiske kendetegn for olivenolie og olie af olivenpresserester samt metoder til bedømmelse af kendetegnene. Fra den 1. november 2001 fastsætter definitionen af kategorien rå olie af olivenpresserester, jf. punkt 4 i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF, at visse olivenolier, der er udvundet af olivenpresserester, med undtagelse af bestemte kendetegn svarer til bomolie.

(6) I forbindelse med den nye organoleptiske vurderingsmetode bør der kunne anvendes en mæglingsprocedure, hvis der er modstrid mellem den anmeldte kategori og den kategori, der tildeles af det godkendte panel, som foretager bedømmelsen.

(2) For at skelne mellem olie, der er udvundet ved centrifugering af olivenpresserester, og bomolie bør der i mangel af et analyseparameter fastlægges grænseværdier for sammensætningen af voks og erytrodiol og uvaol og det samlede indhold af alifatiske alkoholer, så der uanset fremstillingsmetode kan skelnes mellem disse olier. Med henblik herpå bør der fastlægges en metode til bestemmelse af det samlede indhold af alifatiske alkoholer.

(7) For at betingelserne for udførelsen af analyserne kan være til stede og i betragtning af regionernes geografiske spredning, må der fastsættes forskellige frister for indsendelse af prøverne til laboratoriet efter udtagningen under hensyntagen til klimaforholdene på hver årstid. For klassificeringen af olierne bør det præciseres, at analyseresultaterne sammenlignes med grænseværdierne fastlagt i forordning (EØF) nr. 2568/91, der allerede tilgodeser de anvendte analysemetoders repeterbarheds- og reproducerbarhedsmargener.

(3) Som følge af de nye grænseværdier er det nødvendigt at ændre punkt 2 i de supplerende bestemmelser i kapitel 15 i den kombinerede nomenklatur, der er anført i bilag I til forordning (EØF) nr. 2658/87. Ved samme lejlighed bør artikel 5 i og bilag XIV til forordning (EØF) nr.

(8) For at give tid til tilpasningen til de nye normer og indførelsen af de nødvendige midler til anvendelse af dem og for ikke at skabe forstyrrelser i samhandelen bør ændringerne fastsat i denne forordning først anvendes fra den 1. september 2002, idet der fastsættes undtagelsesbestemmelser for olivenolie og olie af olivenpresserester, som aftappes til detailsalg inden nævnte dato.

⁽¹⁾ EFT L 172 af 30.9.1966, s. 3025/66.

⁽²⁾ EFT L 201 af 26.7.2001, s. 4.

⁽³⁾ EFT L 256 af 7.9.1987, s. 1.

⁽⁴⁾ EFT L 97 af 13.4.2002, s. 1.

⁽⁵⁾ EFT L 248 af 5.9.1991, s. 1.

⁽⁶⁾ EFT L 276 af 19.10.2001, s. 8.

(9) De i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med den udtalelse, som Forvaltningskomitéen for Fedtstoffer og Toldkodeksudvalget hver har afgivet på deres respektive kompetenceområde —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

I forordning (EØF) nr. 2568/91 foretages følgende ændringer:

1) I artikel 2, stk. 1,

a) affattes tredje led således:

»— til bestemmelse af indholdet af voks: metoden i bilag IV«

b) indsættes følgende led:

»— til bestemmelse af indholdet af alifatiske alkoholer: metoden i bilag XIX.«

2) Artikel 2, stk. 2, affattes således:

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

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

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

3) Artikel 2, stk. 3, andet afsnit, affattes således:

»Med forbehold af bestemmelserne i standard EN ISO 5555 og kapitel 6 i standard ISO 661 beskyttes prøverne hurtigst muligt mod lys og stærk varme og sendes til laboratoriet til analyse senest:

— den tiende arbejdsdag efter udtagningsdagen i månederne oktober-maj, og

— den femte arbejdsdag efter udtagningsdagen i månederne juni-september.«

4) I artikel 2 indsættes som stk. 5:

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

5) Artikel 3 og 3a udgår.

6) Artikel 3b bliver artikel 3.

7) Artikel 4, stk. 1, affattes således:

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

Godkendelsesbetingelserne fastlægges af medlemsstaterne, således at bl.a.

— betingelserne i bilag XII, punkt 4, opfyldes

— det sikres, at panelets leder optrænes af en virksomhed og på betingelser, som er anerkendt af medlemsstaten i den henseende

— godkendelsens gyldighed gøres afhængig af de resultater, der opnås ved en årlig kontrolordning, som medlemsstaten har oprettet.

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

8) Artikel 5 udgår.

9) Bilagene ændres i overensstemmelse med bilaget til nærværende forordning.

Artikel 2

I punkt 2 i de supplerende bestemmelser i kapitel 15 i den kombinerede nomenklatur, der er anført i bilag I til forordning (EØF) nr. 2658/87, foretages følgende ændringer:

1) Punkt B I, litra a), affattes således:

»a) et voksindhold på ikke over 300 mg/kg«.

2) Punkt B I, litra g), nr. 4, affattes således:

»4) organoleptiske egenskaber, der udviser en fejlmedian på over 6, jf. bilag XII til forordning (EØF) nr. 2568/91«.

3) Punkt B II, litra g), affattes således:

»g) organoleptiske egenskaber, der udviser en fejlmedian på ikke over 6, jf. bilag XII til forordning (EØF) nr. 2568/91«.

4) Punkt D, litra b), affattes således:

»b) et indhold af erytrodiol og uvaol på over 4,5«.

Artikel 3

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

Den anvendes for olivenolie og olie af olivenpresserester, der aftappes til detailsalg fra den 1. september 2002.

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

Udfærdiget i Bruxelles, den 6. maj 2002.

På Kommissionens vegne

Franz FISCHLER

Medlem af Kommissionen

BILAG

1. I bilagsoversigten i forordning (EØF) nr. 2568/91 foretages følgende:
 - a) Bilag XIV: Punkt 2, 3 og 4 i de supplerende bestemmelser i kapitel 15 i den kombinerede nomenklatur udgår.
 - b) Som bilag XIX indsættes: »Bilag XIX: Metode til bestemmelse af indholdet af alifatiske alkoholer«.
2. Bilag I affattes således:

KARAKTERISTIK AF OLIVENOLIER

Type	Surhedsgrad (%) (*)	Peroxydital (mEq O ₂ /kg) (*)	Halogenerede opløsningsmidler (mg/kg) (*) (1)	Voks (mg/kg) (**)	Mættede syrer i 2-stillingen i triglyceridet (%)	Stigmastadien (mg/kg) (2)	Forskel mellem ECN42 HPLC og ECN42, teoretisk beregnet	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	K ₂₇₀ efter aluminiumoxid (3)	Delta-K (*)	Organoleptisk vurdering Median for mangler (Mm) (*)	Organoleptisk vurdering Median for lugt og smag (Mls) (*)
1. Jomfruolie, ekstra	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	Mm = 0	Mls > 0
2. Jomfruolie	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Mm ≤ 2,5	Mls > 0
3. Jomfruolie, almindelig	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Mm ≤ 6,0 (4)	—
4. Bomolie	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 300 (5)	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	—	Mm > 6	—
5. Olivenolie, raffineret	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—	—
6. Olivenolie	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—	—
7. Rå olivenolie af presserester	> 0,5 (**)	—	—	> 350 (6)	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—	—
8. Raffineret olivenolie af presserester	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—	—
9. Olivenolie af presserester	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—	—

(1) Størst tilladt samlet indhold af halogenerede forbindelser påvist med elektronindfangningsdetektor.

For de enkelte påviste forbindelser er den øvre grænse 0,10 mg/kg.

(2) Summen af isomerer, der (eventuelt) kan adskilles på kapitallarkolonne.

(3) Ved kontrol af, om der er raffineret olie til stede, gentages bestemmelsen af K₂₇₀ efter behandling med aluminiumoxid, hvis K₂₇₀ er over grænsen for den pågældende type.

(4) Hvis medianen for smag og lugt er 0, må medianen for mangler højst være 2,5.

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

(6) Olie med et voksindhold mellem 300 og 350 mg/kg betragtes som rå olivenolie af presserester, hvis det samlede indhold af alifatisk alkohol er større end 350 mg/kg, og hvis indholdet af erytrodiol og uvaol er større end 3,5 %.

Type	Syreindhold						Sum af isomerer af transolie-syre (%)	Sum af isomerer af translinol og translinolen (%)	Cholesterol (%)	Brassica-sterol (%)	Campesterol (%)	Stigma-sterol (%)	Betasitosterol (%) ⁽¹⁾	Delta-7-stigma-sterol (%)	Steroler i alt (mg/kg)	Erythrodiol og uvaol (%) ^(**)
	Myristin (%)	Linolen (%)	Arachin (%)	Eicosen (%)	Behen (%)	Lignocerin (%)										
1. Jomfruolie, ekstra	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Jomfruolie	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Jomfruolie, almindelig	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
4. Bomolie	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽²⁾
5. Olivenolie, raffineret	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Olivenolie	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
7. Rå olivenolie af presserester	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽³⁾
8. Raffineret olivenolie af presserester	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
9. Olivenolie af presserester	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Summen af delta-5,23-stigmastadienol + chlosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadienol.

⁽²⁾ Olie med et voksindhold mellem 300 og 350 mg/kg betragtes som bomolie, hvis det samlede indhold af alifatisk alkohol er 350 mg/kg eller derunder, eller hvis indholdet af erythrodiol og uvaol er 3,5 % eller derunder.

⁽³⁾ Olie med et voksindhold mellem 300 og 350 mg/kg betragtes som rå olivenolie af presserester, hvis det samlede indhold af alifatisk alkohol er større end 350 mg/kg, og hvis indholdet af erythrodiol og uvaol er større end 3,5 %

Bemærkninger:

- Analyseresultaterne skal anføres med samme antal decimaler som de tilsvarende værdier i tabellen.
Det sidste tal oprundes med en enhed, hvis det følgende tal overstiger 4.
- Hvis blot én parameter ikke opfylder kravene til type, klassificeres olien som en anden type, eller olien erklæres for ikke at opfylde renhedskravene.
- De kvalitetsparametre, der er mærket med en asterisk (*), indebærer følgende:
 - Bomolie behøver ikke at opfylde kravene for alle disse parametre samtidig (undtagen K₂₃₂).
 - De øvrige jomfruolier skifter type, hvis en eller flere af disse parametre ikke er opfyldt, men forbliver en jomfruolie.
- De kvalitetsparametre, der er mærket med to asterisker (**), indebærer, at alle de pågældende olivenolier af presserester ikke behøver at opfylde kravene for parametrene samtidig.»

3. Bilag X B affattes således:

»BILAG X B

**FREMSTILLING AF METHYLESTERE AF FEDTSYRER FRA OLIVENOLIE OG OLIE AF OLIVENPRESSE-
RESTER**

De to nedenfor anførte metoder anbefales til fremstilling af methylestere af fedtsyrer fra olivenolie og olie af olivenpresserester:

metode A: kold omestring med kaliumhydroxid i methanol

metode B: varm methylering med natriummethylat i methanol efterfulgt af forestring i sur væske.

Valget mellem de to metoder afhænger af, hvilken parameter der skal analyseres, og hvilken olietype der er tale om, på følgende måde:

a) bestemmelse af forskellen mellem det faktiske og det teoretiske indhold af ECN42-triglycerider (Δ ECN42):
— Metode A anvendes til olieprøver af alle typer efter rensning af olien på silicagelkolonne

b) bestemmelse af fedtsyresammensætningen:

- Metode A anvendes direkte på prøver af følgende olietyper:
 - jomfruolie med et indhold af frie fedtsyrer på under 3,3 %
 - raffineret olivenolie
 - olivenolie (blanding af jomfruolie og raffineret olivenolie)
 - raffineret olie af olivenpresserester
 - olie af olivenpresserester (blanding af jomfruolie og raffineret olie af olivenpresserester).
- Metode B anvendes direkte på prøver af følgende olietyper:
 - jomfruolie med et indhold af frie fedtsyrer på over 3,3 %
 - rå olie af olivenpresserester

c) bestemmelse af transfedtsyrer:

- Metode A anvendes direkte på prøver af følgende olietyper:
 - jomfruolie med et indhold af frie fedtsyrer på under 3,3 %
 - raffineret olivenolie
 - olivenolie (blanding af jomfruolie og raffineret olivenolie)
 - raffineret olie af olivenpresserester
 - olie af olivenpresserester (blanding af jomfruolie og raffineret olie af olivenpresserester).
- Metode B anvendes til olieprøver af nedenstående typer efter rensning af olien på silicagelkolonne:
 - jomfruolie med et indhold af frie fedtsyrer på over 3,3 %
 - rå olie af olivenpresserester.

RENSNING AF OLIEPRØVER

Om nødvendigt renses prøverne på silicagelkolonne med en blanding af hexan og diethylether (87:13, v/v) som elueringsmiddel som beskrevet i IUPAC-metode 2.507.

En alternativ metode er fastfaseekstraktion ved hjælp af silicagelatroner. En silicagelatron (1 g, 6 ml) anbringes i et tomt elueringsapparat og skylles med 6 ml hexan. Sugningen standses, så udtørring af kolonnen undgås. Derefter sættes der en opløsning af olien (ca. 0,12 g) i 0,5 ml hexan på kolonnen, og der åbnes for sugningen, så opløsningen trænger ned i silicagelen; derefter elueres der med 10 ml hexan/diethylether (87:13, v/v) med vakuum. Eluatene samles og blandes og deles i to lige store portioner. Den ene portion inddampes til tørhed på rotationsfordamper under reduceret tryk og ved stuetemperatur. Remanensen opløses i 1 ml heptan. Opløsningen er parat til gaskromatografisk analyse. Den anden portion inddampes, og remanensen opløses i 1 ml acetone til HPLC-triglyceridanalyse, hvis det er påkrævet.

METODER TIL FREMSTILLING AF FEDTSYREMETHYLESTERE

1. Metode A: Kold omestring med kaliumhydroxid i methanol

1.1. Anvendelse

Denne hurtigmetode kan anvendes på olivenolie og olie af olivenpresserester med et indhold af frie fedtsyrer på under 3,3 %. De frie fedtsyrer forestres ikke med kaliumhydroxid. Ethylestere af fedtsyrer omestrer langsommere end glycerolestere, og muligvis methyleres de kun delvis.

1.2. Princip

Methylestrene dannes ved omestring i en opløsning af kaliumhydroxid i methanol, hvilket er mellemstadiet inden forsæbning (punkt 5 i metoden i ISO 5509:2000, punkt 5 i IUPAC-metode 2.301).

1.3. Reagenser

methanol med højst 0,5 % (m/m) vand

heptan til kromatografi.

kaliumhydroxid, ca. 2 N opløsning i methanol: 11,2 g kaliumhydroxid opløses i 100 ml methanol.

1.4. Apparatur

reagensglas (rumindhold: 5 ml) med skrueprop med teflonpakning

målepipetter eller automatpipetter på 2 ml og 0,2 ml.

1.5. Fremgangsmåde

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

2. Metode B: Varm methylering med natriummethylat i methanol efterfulgt af forestring i sur væske**2.1. Anvendelse**

Denne metode kan anvendes på olivenolie og olie af olivenpresserester med et indhold af frie fedtsyrer på over 3,3 %.

2.2. Princip

Neutralisering af frie fedtsyrer og alkalisk methanolyse af glycerider efterfulgt af forestring af fedtsyrerne i sur væske (punkt 4.2 i IUPAC-metode 2.301).

2.3. Reagenser

— heptan til kromatografi

— methanol med højst 0,05 % (m/m) vand

— natriummethanolat, 0,2 N opløsning i methanol: 5 g natrium opløses i 1 000 ml methanol (kan fremstilles ud fra indkøbte opløsninger).

— phenolphthalein, 0,2 % opløsning i methanol

— svovlsyre, 1 N opløsning i methanol: Der tilsættes 3 ml 96 % svovlsyre til 100 ml methanol

— mættet opløsning af natriumchlorid i vand.

2.4. Apparatur

— 50 ml målekolbe med flad bund og høj snæver hals med slib

— tilbagesvaler: luftkøler (1 m lang) med slib

— kogesten

— glastragt.

2.5. Fremgangsmåde

0,25 g af olieprøven anbringes i en 50 ml målekolbe med slib. Gennem tragten tilsættes der 10 ml 0,2 N natriummethanolatopløsning i methanol og kogesten. Tilbagesvaleren påsættes, og efter omrystning bringes opløsningen i kog. Opløsningen skal være klar efter ca. 10 minutter. Reaktionen er praktisk taget afsluttet efter 15 minutter. Kolben tages af varmen, tilbagesvalingen standses, svaleren fjernes, og der tilsættes to dråber phenolphthaleinopløsning. Der tilsættes nogle ml 1 N svovlsyre i methanol, indtil opløsningen bliver farveløs, og der tilsættes endnu 1 ml i overskud. Svaleren påsættes, og der koges i endnu ca. 20 minutter. Kolben tages af varmen og afkøles under rindende vand. Svaleren fjernes, der tilsættes 20 ml mættet natriumchlorid, og der omrystes. Der tilsættes 5 ml heptan, kolben tilproppes, og der rystes kraftigt i 15 sekunder.

Blandingen henstilles, indtil faserne er helt adskilt. Der tilsættes mættet natriumchloridopløsning, indtil vandfasen når op til kolbehalsens underkant. Det øvre lag, der befinder sig i kolbehalsen, indeholder methylestrene. Opløsningen er parat til injektion i gaskromatografen.

Forsigtig: Methylering ifølge metode B skal udføres i stinkskab.

2.6. Alternativ til methylering ifølge metode B

2.6.1. Metode C

2.6.1.1. Princip

Fedtstoffet, der skal analyseres, behandles med en opløsning af chlorbrinte i methanol i et forsejlet glas ved 100 °C.

2.6.1.2. Apparatur

- tykvægget glas med et rumindhold på ca. 5 ml (højde 40-45 mm, diameter 14-16 mm)
- målepipetter, 1 og 2 ml.

2.6.1.3. Reagenser

2 % opløsning af chlorbrinte i methanol, fremstillet ud fra chlorbrintegas og vandfri methanol (note 1).

Hexan til kromatografi.

Note 1: Der kan benyttes indkøbte opløsninger af chlorbrinte i methanol. Det er nemt at fremstille små mængder chlorbrinte i laboratoriet ved simpel uddrivning fra den i handelen værende saltsyre ($d = 1,18$) ved tildrypning af koncentreret svovlsyre. Da methanol let optager chlorbrintegas, bør der træffes de sædvanlige forholdsregler ved opløsningen (f.eks. tilføres gassen ved hjælp af en lille omvendt tragt, der netop rører metanoloverfladen). Større mængder methanolopløsning af chlorbrinte kan fremstilles i forvejen; de er holdbare ved opbevaring i mørke i kolber med glasprop. Reagenset kan også fremstilles ved opløsning af acetylchlorid i vandfri metanol.

2.6.1.4. Fremgangsmåde

- I glasset anbringes 0,2 g af fedtstoffet, som forinden er tørret over natriumsulfat og filtreret, og der tilsættes 2 ml af methanolopløsningen af chlorbrinte. Glasset lukkes.
- Glasset neddyppes ved 100 °C i 40 minutter.
- Glasset afkøles under rindende vand og åbnes, og der tilsættes 2 ml destilleret vand og 1 ml hexan.
- Blandingen centrifugeres, og hexanfasen, som er klar til brug, kan udtages.

2.6.2. Metode D

2.6.2.1. Princip

Fedtstoffet, der skal analyseres, opvarmes med tilbagesvaling med methanol, hexan og svovlsyre. Methylestrene ekstraheres med petroleumsether.

2.6.2.2. Apparatur

- reagensglas på ca. 20 ml med glasslib og med en ca. 1 m lang luftsvæler.
- 5 ml målepipette
- 50 ml skilletragt
- 10 og 25 ml reagensglas
- 15 ml spidsbundet reagensglas.

2.6.2.3. Reagenser

- methyleringsreagens: vandfri methanol, hexan og koncentreret svovlsyre ($d = 1,84$) i forholdet 75:25:1 (v/v/v)

- 40-60 °C petroleumsether
- vandfrit natriumsulfat.

2.6.2.4. Fremgangsmåde

I glasset på 20 ml anbringes 0,1 g olie, og der tilsættes 5 ml methyleringsreagens.

Svaleren påsættes, og der opvarmes i 30 minutter på kogende vandbad (note 2).

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, indtil faserne er adskilt. Vandfasen fjernes, og etherlaget vaskes to gange med 20 ml destilleret vand. Skilletragten tilsættes en lille mængde vandfrit natriumsulfat, der omrystes, blandingen henstår i nogle få minutter, og der filtreres, idet filtratet opsamles i et 15 ml spidsbundet reagensglas.

Opløsningsmidlet afdampes på vandbad med en strøm af nitrogen.

Note 2: For at holde kogningen under kontrol kan man indsætte en glasstav i reagensglasset og begrænse vandbadets temperatur til 90 °C.

3. Nøjagtighed

Det Internationale Olivenolieråd har i forbindelse med sin metode COI/T.20/dok. nr. 24 offentliggjort en statistisk vurdering af nøjagtigheden ved metode A og B.

ANVISNINGER FOR GASKROMATOGRAFI AF ESTERE AF FEDTSYRER FRA OLIVENOLIE OG OLIE AF OLIVEN-PRESSERESTER

1. Fremgangsmåde

Gaskromatografi af opløsninger af fedtsyreestere i hexan udføres ifølge ISO 5508 på kapillarkolonne (50 m lang, indre diameter 0,25 eller 0,32 mm) belagt med cyanopropylsilicone som angivet ved bestemmelse af trans-fedtsyrer (COI/T.20/dok. nr. 17).

Figur 1 viser et typisk kromatogram af olie af olivenpresserester, som indeholder methyl- og ethylestere af fedtsyrer og transisomerer af methylestere.

2. Beregninger

2.1. Ved beregning af sammensætningen af fedtsyrer og Δ ECN42 skal følgende fedtsyrer medregnes:

myristinsyre (C14:0)

palmitinsyre (C16:0) — summen af arealerne af methyl- og ethylestertoppene

palmitolsyre (C16:1) — summen af arealerne af toppene for ω 9- og ω 7-isomererne af methylestere

heptadecansyre (C17:0)

heptadecansyre (C17:1)

stearinsyre (C18:0)

oliesyre (C18:1) summen af arealerne af toppene for ω 9- og ω 7-isomererne af methylestere, ethylestere og transisomererne af methylestere

linolsyre (C18:2) — summen af arealerne af toppene for methyl- og ethylestere og transisomererne af methylestere

arachinsyre (C20:0)

linolensyre (C18:3) — summen af toppene for methylestere og transisomererne af methylestere

eicosensyre (C20:1)

behensyre (C22:0)

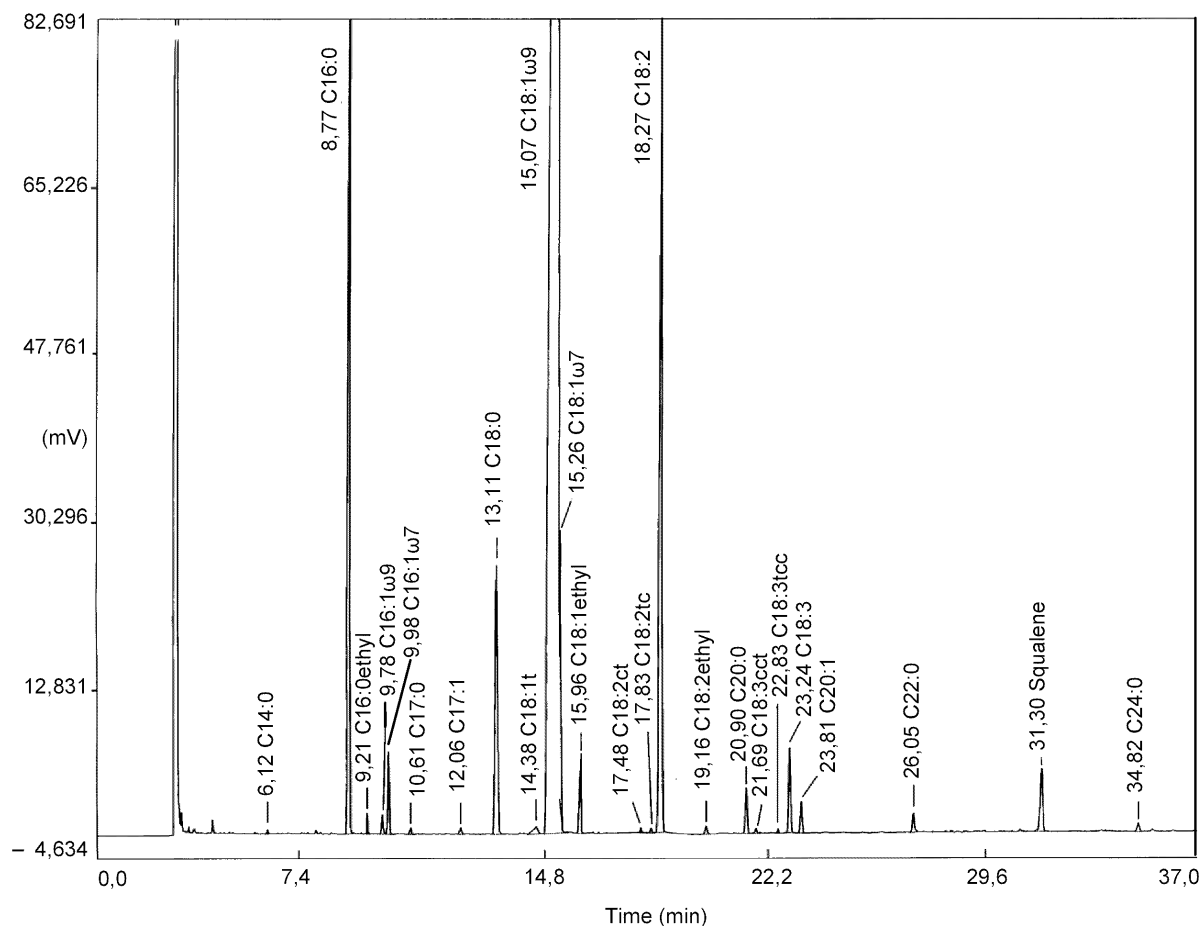
lignocerinsyre (C24:0).

Squalen medregnes ikke ved beregningen af det samlede areal.

2.2. Til beregning af det procentvise indhold af trans-C18:1 benyttes toppen for methylestere af denne fedtsyre. For at få summen (trans-C18:2 + trans-C18:3) adderes alle toppene for transisomererne af disse to fedtsyrer. Ved beregning af det samlede areal medregnes alle de toppe, der er nævnt i punkt 2.1 (jf. COI/T.20/dok. nr. 17).

Procentindholdet af de enkelte fedtsyrer beregnes efter følgende formel:

$$\% X = (\text{areal } X \times 100) / (\text{samlet areal})$$



Figur 1: Typisk kromatogram af olie af olivenpresserester, fremkommet ved metoden med kold methylering. Toppene er for methylestrener, hvor intet andet er anført.»

4. Bilag XII affattes således:

»BILAG XII

ORGANOLEPTISK VURDERING AF JOMFRUOLIER

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Formålet med denne metode er at fastlægge de nødvendige kriterier for vurdering af de organoleptiske kendetegn for jomfruolier, jf. punkt 1 i bilaget til forordning nr. 136/66/EØF, og at beskrive metoden til klassifikation.

Den beskrevne metode er kun anvendelig til klassifikation af jomfruolier i forhold til den frugtagtige karakter og manglernes intensitet, der bestemmes af en gruppe udvalgte og optrænede smagere, der er nedsat som et panel i overensstemmelse med punkt 4.

2. GENERELT

Hvad den almindelige grundordliste, prøvelokale, generelle metoder og glas til oliesmagning angår, henvises der til de forskrifter, som er fastsat af Det Internationale Olivenolieråd.

3. SPECIEL ORDLISTE

3.1. Positive egenskaber

Frugtagtig: en række duftfornemmelser, der afhænger af olivensort og kendetegn for en olie, som er udvundet af sunde og friske, grønne eller modne frugter, og som fornemmes direkte eller retronasalt.

Bitter: karakteristisk smag af olie, der er udvundet af grønne oliven eller oliven, der er lige ved at skifte farve.

Stærk: en prikkende fornemmelse, der er karakteristisk for olier, som er udvundet i produktionsårets begyndelse især af endnu grønne oliven.

3.2. Negative egenskaber

Muggen: karakteristisk flavour for olie, der er udvundet af oliven, som er opbevaret i bunker, og som har nået et fremskredet stadium af anaerob gæring.

Mug-fugt: karakteristisk flavour for olie udvundet af oliven, hvori svampe og gær har udviklet sig, fordi de har været opbevaret i adskillige dage i fugtige omgivelser.

Mudret bundfald: karakteristisk flavour for olie, der er udvundet af dekanteret bundfald i kar og underjordiske tanke.

Vinagtig-eddikeagtig: karakteristisk flavour for visse olier, som minder om vin eller eddike. Skyldes hovedsagelig, at der dannes eddikesyre, ethylacetat og ethanol ved gæring af oliven.

Metallisk: flavour, der minder om metal. Karakteristisk for olie, der har været i langvarig kontakt med metaloverflader under knusning, blanding, presning eller opbevaring.

Harsk: flavour i olie, der har undergået en oxideringsproces.

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

Hø-træ: karakteristisk flavour for visse olier, der er udvundet af tørre oliven.

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

Fedt: flavour i olie, der minder om jordolie, fedt eller mineralsk olie.

Grønsagsvand: flavour, som olien får som følge af langvarig kontakt med grønsvand.

Saltlage: flavour i olie, der er udvundet af oliven, som har været konserveret i saltlage.

Esparto: karakteristisk flavour for olie, der er udvundet af oliven, som er presset i nye måtter af espartogræs. Lugten/smagen kan være forskellig, alt efter om måtterne er lavet af grønt eller tørret espartogræs.

Jordet: flavour i olie, der er udvundet af oliven, som er opsamlet med jord eller mudder på overfladen, og som ikke er blevet vasket.

Larvebefængt: flavour i olie, der er udvundet af oliven, som har været hårdt angrebet af larver af olivenfluen (*Bactrocera oleae*).

Agurk: karakteristisk flavour, der fremkommer, når en olie har været pakket hermetisk i for lang tid, især i blikbeholdere, og som tilskrives dannelsen af 2,6-nonadienal.

4. PANEL

Panelet udnævnes af medlemsstaten og består af en panelleder og otte til 12 smagere. For produktionsåret 2001/02 kan antallet af smagere dog være mindre end otte.

Panellederen skal have gennemgået en grundig optræning og være kyndig ekspert i de forskellige olietyper. Han er ansvarlig for panelet og dets tilrettelæggelse og funktion, for prøvernes forberedelse, kodning og præsentation for smagerne samt for indsamling af data og deres statistiske behandling.

Panellederen udvælger smagerne og sørger for deres optræning og kontrol af deres indsats for at sikre sig, at de opretholder et passende egnethedsniveau.

Smagere, der foretager organoleptisk kontrol af olivenolie, skal udvælges og optrænes i forhold til deres evne til at skelne mellem prøver, der ligner hinanden, i overensstemmelse med Det internationale Olivenolieråds vejledning om udvælgelse, optræning og kontrol af kvalificerede jomfruoliesmagere.

Panelerne skal forpligte sig til at deltage i organoleptiske bedømmelser på nationalt, EF- eller internationalt plan med henblik på periodisk kontrol og harmonisering af sansningskriterier. De skal i øvrigt hvert år meddele den pågældende medlemsstat alle data om deres sammensætning og antallet af bedømmelser, de har udført som godkendt panel.

5. PROCEDURE FOR ORGANOLEPTISK BEDØMMELSE OG KLASSIFIKATION

5.1. Smagerens anvendelse af profilskemaet

Det profilskema, som smageren skal benytte, er anført i tillæg A til denne metode.

Hver smager i panelet skal lugte til og derpå smage på ⁽¹⁾ den olieprøve, der er i smageglasset. Smageren analyserer de olfaktoriske, gustatoriske, taktile og kinaestetiske indtryk. På profilskemaet noterer han derpå den intensitet, hvormed han opfatter negative og positive egenskaber.

Hvis smageren opfatter negative egenskaber, som ikke er anført på profilskemaet, skal han anføre dem i rubrikken »Andet«, idet han benytter det eller de udtryk, som beskriver dem med den størst mulige præcision af de udtryk, som er defineret i punkt 3.2 i denne metode.

5.2. **Panellederens anvendelse af data**

Panellederen indsamler de profilskemaer, som smagerne har udfyldt; han kontrollerer de tildelte intensiteter; konstaterer han en anormalitet, anmoder han smageren om at ændre sit profilskema og om nødvendigt at gentage forsøget.

Panellederen kan indlæse data i et edb-program efter den metode til statistisk beregning af medianen, der er anført i B. Data for en prøve registreres på en matrix bestående af ti kolonner, der svarer til de ti sanseegenskaber, og antal linjer svarende til antal smagere i panelet.

Hvis mindst 50 % af panelet anfører en negativ egenskab i rubrikken andet, skal panellederen beregne medianen for denne egenskab og den tilsvarende klassifikation.

Hvis der foretages analyser i forbindelse med kontrol af overholdelse af normer eller kontrolanalyser, skal panellederen gennemføre en tredobbelt organoleptisk bedømmelse af olien med mindst en dags mellemrum; medianen for egenskaberne beregnes ud fra samtlige data på profilskemaerne for de tre forsøg.

5.3. **Klassifikation af olier**

Olien klassificeres under nedennævnte betegnelser i forhold til medianen af mangler og medianen for egenskaben frugtagtig. Ved medianen af manglerne forstås medianen af den negative egenskab, der opfattes med den stærkeste intensitet. Værdien af den robuste variationskoefficient for denne negative egenskab skal være mindre end eller lig med 20 %.

- a) *Jomfruolie, ekstra*: Medianen af manglerne er lig med 0, og medianen af den frugtagtige karakter er større end 0.
- b) *Jomfruolie*: Medianen af manglerne er større end 0 og lig med eller mindre end 2,5, og medianen af den frugtagtige karakter er større end 0.
- c) *Jomfruolie, almindelig*: Medianen af manglerne er større end 2,5 og lig med eller mindre end 6,0; eller medianen af manglerne er lig med eller mindre end 2,5, og medianen af den frugtagtige karakter er lig med 0.
- d) *Bomolie*: Medianen af manglerne er større end 6,0.
Fra den 1. november 2003 erstattes typerne c) og d) dog med følgende type:
c) *Bomolie*: Medianen af manglerne er større end 2,5; eller medianen af manglerne er lig med eller mindre end 2,5, og medianen af den frugtagtige karakter er lig med 0.

5.4. **Særlige tilfælde**

Hvis medianen for en anden positiv egenskab end frugtagtig er større end 5,0, anfører panellederen dette på oliens analyseattest.

⁽¹⁾ Smageren kan undlade at smage på olien, hvis han konstaterer særligt intense negative egenskaber, og han noterer denne ekstraordinære omstændighed på profilskemaet.

TILLÆG A

Profilskema

(benyttes af smageren)

SANSNING AF MANGLER	INTENSITET
Muggen	→
Mug-fugt	→
Vinagtig-eddikeagtig	→
Mudret bundfald	→
Metallisk	→
Harsk	→
Andet (specificeres)	→
SANSNING AF POSITIVE EGENSKABER	
Frugtagtig	→
Bitter	→
Stærk	→

Smagerens navn:Prøvens kode:Dato:

TILLÆG B

METODE TIL BEREGNING AF MEDIAN OG KONFIDENSINTERVALLER

Median

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

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

Robust standardafvigelse

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

Som et pålideligt estimat af variabiliteten omkring medianen benyttes Stuart og Kendall's estimat over den robuste standardafvigelse. Formlen for den asymptotiske standardafvigelse S afhænger af N og IQR. N er antallet af observationer, og IQR er den interkvartile afstand, dvs. det robuste estimat af variabiliteten af de pågældende data (den interkvartile afstand dækker nøjagtig 50 % af elementerne i en given sandsynlighedsfordeling). Den interkvartile afstand beregnes som afstanden mellem den 75. og 25. percentil.

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

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

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

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

Robust variationskoefficient i %

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

Variationskoefficienten er et rent (dvs. dimensionløst) tal, der angiver forholdet mellem den procentvise variabilitet i den analyserede talrække og medianens værdi Me . Af denne grund er variationskoefficienten til stor nytte som kontrol af panelmedlemmernes pålidelighed.

95 %-konfidensintervaller

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

$$\text{IC sup.} = Me + (c.S)$$

$$\text{IC inf.} = Me - (c.S)$$

Hvor c , hvis konfidensintervallet er på 0,95, er lig med 1,96.

Klassifikationen foretages ved at sammenligne værdierne af medianen med de referenceintervaller, der er fastlagt i metodens punkt 5.3. Med edb-programmer er det muligt at vise klassifikationen i en tabel med statistiske data eller som grafik.»

5. Bilag XIV udgår.
6. Følgende bilag XIX indsættes:

»BILAG XIX

BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF ALIFATISKE ALKOHOLER VED GASKROMATOGRAFI PÅ KAPILLAR-SØJLE

1. ANVENDELSESOMRÅDE

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 refluxvaler med samlinger med glasslib
- 3.2. 500 ml skilletragt
- 3.3. 250 ml kolber
- 3.4. komplet apparatur til analyse ved tyndtlagskromatografi med 20 × 20 cm glasplader.
- 3.5. ultraviolet lampe med en bølgelængde på 366 eller 254 nm
- 3.6. 100 og 500 µl mikrosprøjter
- 3.7. en cylindrisk filtertragt med G3-glasfritte (porøsitet 15-40 µm), med en diameter på ca. 2 cm og en højde på ca. 5 cm, egnet til vakuumfiltrering og med et 12/21 udvendigt konisk glasslib
- 3.8. en 50 ml konisk vakuumkolbe med et 12/21 indvendigt konisk glasslib, som filtertragten (punkt 3.7) kan monteres på
- 3.9. et 10 ml prøverør med konisk bund og tætsluttende prop
- 3.10. en gaskromatograf, der er egnet til brug med kapillarsøjle, har et splittersystem og 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 injektionsenhed med temperaturindstilling, med et fordampningselement af silanglas
 - 3.10.3. en flammeioniseringsdetektor og en omformer-forstærker
 - 3.10.4. en integrerende skriver, der er egnet til brug med omformer-forstærkeren (punkt 3.10.3), og som har en svartid på ikke over ét sekund og variabel papirhastighed
- 3.11. en kapillarsøjle af glas eller kvartsglas, med en længde på 20-30 m, en indre diameter på 0,25-0,32 mm, indvendig belagt med SE-52- eller SE-54-væskefase eller tilsvarende i en ensartet tykkelse på mellem 0,10 og 0,30 µm
- 3.12. en 10 µl gaskromatografi-mikrosprøjte med hærdet kanyle.
- 3.13. præcisionsvægt med en følsomhed på 1 mg (angivelse af 0,1 mg).

4. REAGENSER

- 4.1. kaliumhydroxid, ca. 2 N, i ethanolopløsning: 130 g kaliumhydroxid (titer: min. 85 %) opløses i 200 ml destilleret vand under afkøling, og der fyldes op med ethanol til 1 liter. Opløsningen opbevares i veltilpropede, mørke glasflasker
- 4.2. diethylether, analysereen
- 4.3. vandfrit natriumsulfat, analyserent

- 4.4. glasplader belagt med kiselgel uden fluorescensindikator, tykkelse 0,25 mm (kan fås brugsfærdige i handelen)
- 4.5. kaliumhydroxid, ca. 0,2 N, i ethanolopløsning: 13 g kaliumhydroxid opløses i 20 ml destilleret vand, og der fyldes op med ethanol til 1 liter
- 4.6. benzen, til kromatografi (punkt 5.2.2)
- 4.7. acetone, til kromatografi (punkt 5.2.2)
- 4.8. hexan, til kromatografi (punkt 5.2.2)
- 4.9. diethylether, til kromatografi (punkt 5.2.2)
- 4.10. chloroform, analysere
- 4.11. referenceopløsning til tyndtlagskromatografi: kolesterol 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. hexametyldisilazan
- 4.15. trimethylchlorsilan
- 4.16. standardopløsninger af trimethylsilyl ether (TMSE) af de alifatiske alkoholer fra C₂₀ til C₂₈, friskfremstillede ud fra blandinger af rene alkoholer
- 4.17. 1-eicosanol, 0,1 % (m/v)-opløsning i chloroform (intern standard)
- 4.18. bæregas: hydrogen eller helium, ren, til gaskromatografi
- 4.19. hjælpegas: nitrogen, ren, til gaskromatografi.

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. Fremstilling af de uforsæbelige stoffer

- 5.1.1. Et rumfang 0,1 %-1-eicosanolopløsning i chloroform (punkt 4.17), der indeholder en mængde 1-eicosanol (man kan ligeledes anvende 1-eneicosanol) svarende til ca. 10 % af indholdet af alifatiske alkoholer i den del af prøven, der er taget ud til bestemmelsen, overføres til 250 ml-kolben ved hjælp af 500 µl-mikrosprøjten. F.eks. sættes til 5 g af prøven 250 µl 0,1 %-1-eicosanolopløsning, hvis undersøgelsen gælder 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 er sket (opløsningen bliver klar). Opvarmningen fortsættes i endnu 20 minutter, derefter tilsættes 50 ml destilleret vand ovenfra gennem svaleren, svaleren tages af, og kolben afkøles til ca. 30 °C.
- 5.1.3. Kolbens indhold overføres kvantitativt til en 500 ml-skilletragt, idet der skylles flere gange med destilleret vand, i alt ca. 50 ml. Ca. 80 ml diethylether tilsættes, tragten rystes kraftigt i ca. 30 sekunder og får lov til at henstå (note 1).

Den nedre vandige fase tappes af og opsamles i en anden skilletragt. Yderligere to ekstraktioner foretages på den vandige fase på samme måde, idet der bruges 60-70 ml diethylether hver gang.

Note 1: En eventuel emulsion kan brydes ved tilsætning af en lille mængde ethyl- eller methylalkohol ved hjælp af en spray.

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

Når vaskevandet er fjernet, tørres ekstrakterne med vandfrit natriumsulfat og filtreres over vandfrit natriumsulfat ned i en på forhånd vejret 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 efter afkøling i en ekssikator.

5.2. Separation af alkoholfraktionen

- 5.2.1. Forberedelse af de basiske plader: Kiselgelpladerne (punkt 4.4) nedsænkes fuldstændig i 0,2 N-opløsningen af kaliumhydroxid i ethanol (punkt 4.5) i 10 sekunder, tørrer under emhætte i 2 timer og sættes til sidst i en ovn ved 100 °C i 1 time.

Pladeren tages ud af ovnen og opbevares i en ekssikator med calciumchlorid, til de skal bruges (plader, der er behandlet på denne måde, skal anvendes inden 15 dage).

Note 2: Når basiske kiselgelplader benyttes til at separere alkoholfraktionen, er det ikke nødvendigt at behandle de ikke-forsæbelige stoffer med aluminiumoxid. På denne måde holdes alle sure forbindelser (fedtsyrer og andre syrer) tilbage på basislinjen, og båndet med alifatiske alkoholer og terpenalkoholer bliver klart adskilt fra sterolbåndet.

- 5.2.2. Der hældes 65:35 (v/v)-hexan/ethyletherblanding i kromatografikammeret til en højde på ca. 1 cm (*).

Kammeret lukkes med det dertil passende låg og henstår i ca. en halv time, så at der opnås ligevægt mellem væske og damp. Strimler af filterpapir, der dypper ned i eluenten, kan anbringes på kammerets indre overflader. Dette reducerer elueringstiden med ca. en tredjedel og giver en mere ensartet og regelmæssig eluering af komponenterne.

Note 3: Kromatografiblandingen bør udskiftes for hver test for at opnå fuldstændig reproducerbare elueringsbetingelser.

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

- 5.2.4. Pladen anbringes i kromatografikammeret, der er forberedt som angivet i punkt 5.2.2. Temperaturen bør holdes mellem 15 og 20 °C. Kammeret lukkes straks med låget, og der elueres, indtil opløsningsmiddel-fronten er 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 under emhætte.

- 5.2.5. Pladen sprøjtes let og ensartet med 2,7-dichlorfluoresceinopløsningen. Båndet med alifatiske alkoholer identificeres ved, at det ligger på linje med pletten fra referenceopløsningen, hvorefter båndet med alifatiske alkoholer og båndet umiddelbart derover, som indeholder triterpenalkoholer, markeres med en sort blyant.

Note 4: Anvisningen om at udtage både båndet med alifatiske alkoholer og båndet med triterpenalkoholer skyldes, at under denne metodes betingelser er der en betydelig mængde alifatiske alkoholer i båndet med triterpenalkoholer.

- 5.2.6. Med en metalspatel skræbes kiselgelen i det markerede område af. Det fjernede materiale pulveriseres fint og placeres i filtertragten (punkt 3.7). Der tilsættes 10 ml varm chloroform, blandes omhyggeligt med metalspatelen og filtreres under vakuum; filtratet opsamles i den koniske kolbe (punkt 3.8), der er forbundet med filtertagten.

Materialet i tragten vaskes tre gange med diethylether (ca. 10 ml ad gangen), idet filtratet samles i den samme kolbe, der er forbundet med filtertagten. Filtratet inddampes til et rumfang af 4-5 ml, som overføres til det på forhånd vejede 10 ml-prøverør (punkt 3.9), og der inddampes til tørhed med let opvarmning i en svag strøm af nitrogen. Remanensen genopløses i nogle få dråber acetone, der inddampes igen til tørhed, røret placeres i en ovn ved 105 °C i ca. 10 minutter, og det afsvales i en ekssikator og vejes.

Remanensen i prøverøret udgør alkoholfraktionen.

5.3. Fremstilling af trimethylsilyl-ethere (TMSE)

- 5.3.1. Til prøverøret med alkoholfraktionen sættes silyleringsreagenset, der består af en 9:3:1 (v/v/v)-blanding af pyridin/hexamethyl-disilazan/trimethylchlorsilan (note 5), i en mængde af 50 µl pr. milligram alkohol, idet enhver optagelse af fugt undgås (note 6).

Note 5: Brugsfærdige opløsninger kan fås i handelen. Man kan også få andre silyleringsreagenser som f.eks. bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamid + 1 % trimethylchlorsilan, som skal fortyndes med et lige så stort rumfang vandfri pyridin.

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, at der er fugt til stede, eller at reagenset ikke er i orden. Hvis det forekommer, må prøven gentages.

- 5.3.2. Prøverøret tilproppes, rystes omhyggeligt (uden at vende bunden i vejret på det), indtil alkoholerne er fuldstændig opløst. Efter mindst 15 minutters henstand ved stuetemperatur centrifugeres der i nogle få minutter. Den klare opløsning er parat til gaskromatografisk analyse.

(*) I disse tilfælde i særdeleshed benyttes 95:5 (v/v)-benzen/acetoneblandingen for at opnå god adskillelse af båndene.

5.4. Gaskromatografisk analyse

5.4.1. Forberedende operationer, konditionering af søjlen

5.4.1.1. Søjlen monteres i gaskromatografen, idet indløbsenden forbindes med injektoren, der står i forbindelse med splittersystemet, og udløbsenden forbindes med detektoren. Der foretages en generel kontrol af gaskromatografienheden (lækager fra gaskredsløbene, detektorens effektivitet, splittersystemets og skriversystemets effektivitet osv.).

5.4.1.2. Hvis søjlen skal bruges for første gang, anbefales det, at den underkastes en konditionering. Man lader en svag gasstrøm passere gennem søjlen og tænder så for gaskromatografienheden, derefter begynder man gradvis at varme op til en temperatur mindst 20 °C over driftstemperaturen (note 7). Denne temperatur opretholdes i mindst 2 timer, derefter sættes hele systemet i driftstilstand (justering af gasstrømme og splitter, antændelse af flammen, forbindelse til den elektroniske skriver, justering af søjlekammeret, detektorens og injektorens temperatur osv.), og derefter optegnes signalet med en følsomhed, der er mindst to gange større end den, man agter at anvende til analysen. Basislinjens forløb skal være lige, uden toppe af nogen art, og den må ikke drive. Drivning nedad af en lige linje tyder på lækage fra søjlens forbindelser, drivning opad tyder på utilstrækkelig konditionering af søjlen.

Note 7: Konditioneringstemperaturen skal altid være mindst 20 °C lavere end den maksimumtemperatur, der er angivet for den anvendte stationære fase.

5.4.2. Valg af driftsbetingelser

5.4.2.1. Der anbefales følgende vejledende driftsbetingelser:

- søjletemperatur: først konstant temperatur 180 °C i 8 minutter, derefter programmeret stigning med 5 °C/minut op til 260 °C og endelig 15 minutter ved 260 °C
- fordampertemperatur: 280 °C
- detektortemperatur: 290 °C
- bæregassens lineære hastighed: helium 20-35 cm/s, hydrogen 30-50 cm/s
- splitterforhold: fra 1:50 til 1:100
- instrumentets følsomhed: fra 4 til 16 gange den minimale dæmpning
- registreringsfølsomhed: 1-2 mV fuld skala
- papirhastighed: 30-60 cm/time
- mængde stof injiceret: 0,5-1 µl TMSE-opløsning.

Disse betingelser kan varieres alt efter søjlens og gaskromatografens egenskaber, så man opnår kromatogrammer, der opfylder følgende krav:

- Retentionstiden for C₂₆-alkohol skal være 18 ± 5 minutter.
- Toppen for C₂₂-alkohol skal være 80 ± 20 % af fuld skala for olivenolie og 40 ± 20 % af fuld skala for frøolier.

5.4.2.2. For at kontrollere ovenstående krav foretages gentagne injektioner af prøveblandinger af alkohol-TMSE, og driftsbetingelserne justeres, så de bedste resultater opnås.

5.4.2.3. Integrationsparametrene for toppene må fastsættes sådan, at de giver korrekte værdier for de relevante toppe.

5.4.3. Udførelse af analysen

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

5.4.3.2. Skrивeren skal køre, indtil alle alkohol-TMSE er fuldstændig elueret. Basislinjen skal til stadighed opfylde kravene (punkt 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 C_{22} , C_{24} , C_{26} og C_{28} beregnes ved hjælp af integratoren.

5.4.5.2. Koncentrationen af de enkelte simple alifatiske alkoholer beregnes i mg pr. 1 000 g fedtstof som følger:

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

hvor:

A_x = toparealet for alkohol x

A_s = arealet af 1-eicosanoltoppen

m_s = massen af tilsat 1-eicosanol i milligram

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

6. ANGIVELSE AF RESULTATER

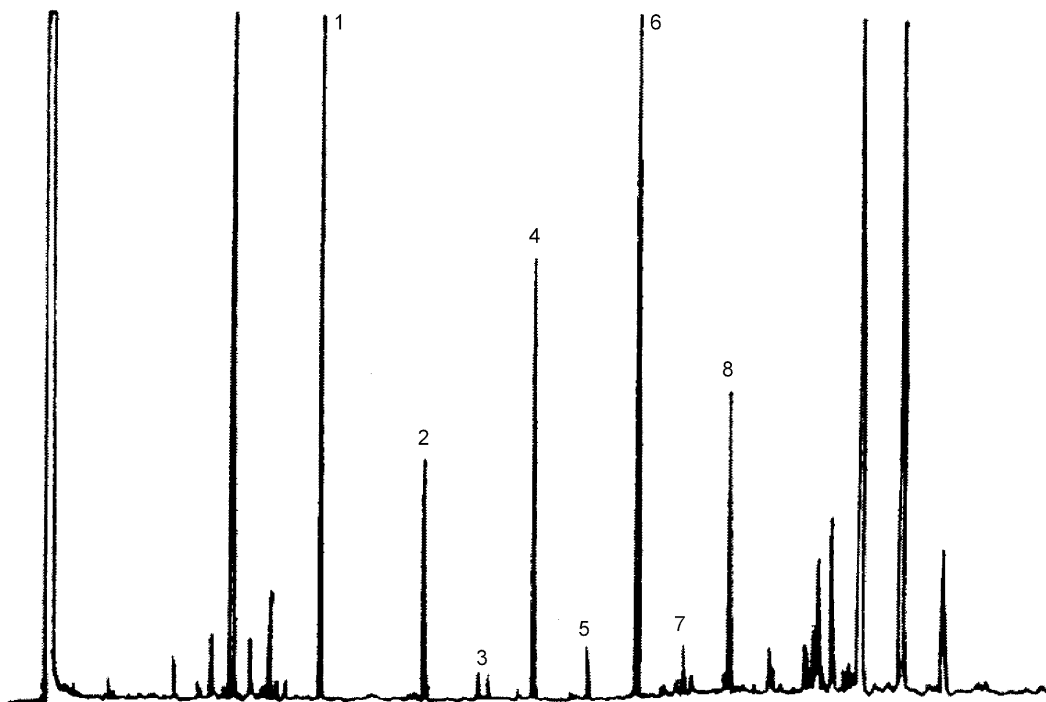
Koncentrationerne af simple alifatiske alkoholer angives i mg pr. 1 000 g fedtstof og deres sum som »total mængde alifatiske alkoholer«.

TILLÆG

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 (tM).

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



Figur 1: Kromatogram af alkoholfraktionen af en jomfruolie

1 = eicosanol	5 = pentacosanol
2 = docosanol	6 = hexacosanol
3 = tricosanol	7 = heptacosanol
4 = tetracosanol	8 = octacosanol