

KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 702/2007

af 21. juni 2007

om ændring af forordning (EØF) nr. 2568/91 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 Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning (EF) nr. 865/2004 af 29. april 2004 om den fælles markedsordning for olivenolie og spiseoliven og om ændring af forordning (EØF) nr. 827/68 ⁽¹⁾, særlig artikel 5, stk. 3, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Ved forordning (EØF) nr. 2568/91 ⁽²⁾ fastsættes der fysiske og kemiske kendetegn for olivenolie og olie af olivenpresserester samt metoder til bedømmelse af kendetegnene. Disse metoder og grænseværdierne for oliens kendetegn bør ajourføres i overensstemmelse med kemisagkyndiges udtalelser og sideløbende med arbejdet i Det Internationale Olivenolieråd.
- (2) Kemikerne har navnlig skønnet, at forestrede olier mere nøjagtigt kan påvises ved kvantitativ bestemmelse af det procentvise indhold af 2-glycerylmonopalmitat. En lavere grænseværdi for stigmastadien i jomfruolier giver ligeledes en bedre adskillelse af jomfruolier og raffinerede olivenolier.
- (3) For at få tilstrækkelig tid til tilpasning til de nye normer og til at træffe de nødvendige foranstaltninger til anvendelse af normerne og for ikke at forstyrre samhandelen bør denne forordning først anvendes fra den 1. januar 2008. Af samme grunde bør det bestemmes, at olivenolie og olie af olivenpresserester, der er lovligt fremstillet og mærket i Fællesskabet eller lovligt indført i Fællesskabet

og overgået til fri omsætning inden den nævnte dato, kan markedsføres, indtil lagrene er opbrugt.

- (4) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra Forvaltningskomitéen for Olivenolie og Spiseoliven —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

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

- 1) Artikel 2, stk. 1, sjette led, affattes således:
»— til bestemmelse af det procentvise indhold af 2-glycerylmonopalmitat, metoden i bilag VII.«
- 2) Bilagene ændres som anført i bilaget til nærværende forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tredjedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Denne forordning anvendes fra den 1. januar 2008.

Produkter, der er lovligt fremstillet og mærket i Fællesskabet eller lovligt indført i Fællesskabet og overgået til fri omsætning inden den 1. januar 2008, kan markedsføres, indtil lagrene er opbrugt.

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

Udfærdiget i Bruxelles, den 21. juni 2007.

På Kommissionens vegne
Mariann FISCHER BOEL
Medlem af Kommissionen

⁽¹⁾ EUT L 161 af 30.4.2004, s. 97. Berigtiget i EUT L 206 af 9.6.2004, s. 37.

⁽²⁾ EFT L 248 af 5.9.1991, s. 1. Senest ændret ved forordning (EF) nr. 1989/2003 (EUT L 295 af 13.11.2003, s. 57).

BILAG

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

1) Resuméet ændres således:

a) Overskriften til bilag II affattes således:

»Bestemmelse af indholdet af frie fedtsyrer, kold metode«

b) Overskriften til bilag VII affattes således:

»Bestemmelse af indholdet af 2-glycerylmonopalmitat i procent«.

2) Bilag I affattes således:

»BILAG I

KENDETEGN FOR OLIVENOLIE

Kategori	Surheds- grad (%) (*)	Peroxidtal mEq O ₂ /kg (*)	Voks mg/kg (**)	2-glycerolmonopalmitat (%)	Stigma- stadien mg/kg (1)	Forskel mellem HPLC og ECN42, teoretisk beregnet	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptisk vurdering Median for mangler (Md) (*)	Organolep- tisk vurde- ring Median for lugt og smag (Mf) (*)
1. Ekstra jomfruolie	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9, hvis palmitinsyre i alt ≤ 14 % ≤ 1,0, hvis palmitinsyre i alt > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Jomfruolie	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9, hvis palmitinsyre i alt ≤ 14 % ≤ 1,0, hvis palmitinsyre i alt > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Bomolie	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9, hvis palmitinsyre i alt ≤ 14 % ≤ 1,1, hvis palmitinsyre i alt > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (2)	—
4. Raffineret olivenolie	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9, hvis palmitinsyre i alt ≤ 14 % ≤ 1,1, hvis palmitinsyre i alt > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Olivenolie bestående af raffinerede olivenolier og jomfruolier	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9, hvis palmitinsyre i alt ≤ 14 % ≤ 1,1, hvis palmitinsyre i alt > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Rå olie af olivenpresserester	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Raffineret olie af olivenpresserester	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Olie af olivenpresserester	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Summen af isomerer, der eventuelt kan adskilles på kapillarsøjle.
(2) Eller hvis medianen for mangler er 2,5 eller derunder, og medianen for lugt og smag er 0.
(3) Olier med et voksindhold på mellem 300 mg/kg og 350 mg/kg betragtes som bomolie, hvis det samlede indhold af alifatiske alkoholer er på 350 mg/kg eller derunder, eller hvis indholdet af erytrodiol og uvaol er på 3,5 % eller derunder.
(4) Olie med et voksindhold på mellem 300 mg/kg og 350 mg/kg betragtes som rå olie af olivenpresserester, hvis det samlede indhold af alifatiske alkoholer er på over 350 mg/kg, og hvis indholdet af erytrodiol og uvaol er på over 3,5 %.

Kategori	Fedsyreindhold ⁽¹⁾						Summen af isomerer af trans-linolinsyre og trans-linolen-syre (%)	Sterolsammensætning						Steroler i alt (mg/kg)	Erythrodiol og uvaol (%) ^(**)
	Myristin (%)	Linolen (%)	Arachin (%)	Eicosan (%)	Behen (%)	Lignocerin (%)		Kolesteryl (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol (%)	Stigmasterol (%)	Betasitosterol (%) ⁽²⁾	Delta-7-stigmastenol (%)		
1. Ekstra jomfruolie	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Jomfruolie	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Bomolie	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Raffineret olivenolie	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Olivenolie, blandet	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Rå olie af olivenpresserester	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾
7. Raffineret olie af olivenpresserester	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Olie af olivenpresserester	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Indhold af andre fedtsyrer (%): palmitinsyre: 7,5-20,0; palmitolsyre: 0,3-3,5; heptadecansyre: ≤ 0,3; stearinsyre: 0,5-5,0; oliesyre: 55,0-83,0; linolsyre: 3,5-21,0.
⁽²⁾ Summen af: delta-5-23-stigmastadienol + clerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5-24-stigmastadienol.
⁽³⁾ Olier med et voksindhold på mellem 300 mg/kg og 350 mg/kg betragtes som bomolie, hvis det samlede indhold af alifatiske alkoholer er på 350 mg/kg eller derunder, eller hvis indholdet af erythrodiol og uvaol er på 3,5 % eller derunder.
⁽⁴⁾ Olie med et voksindhold på mellem 300 mg/kg og 350 mg/kg betragtes som rå olie af olivenpresserester, hvis det samlede indhold af alifatiske alkoholer er på over 350 mg/kg, og hvis indholdet af erythrodiol og uvaol er på over 3,5 %.

Bemærkninger:

a) Analyseresultaterne skal anføres med lige så mange decimaler som dem, der er angivet for hvert kendetegn.

b) Sidste ciffer skal forhøjes med en enhed, hvis det følgende ciffer er større end 4.

c) Hvis de fastsatte grænseværdier overskrides for blot ét kendetegn, klassificeres olien i en anden kategori eller erklæres for ikke at opfylde renhedskravene.

d) Hvis et kvalitetskendtegn er mærket med en asterisk (*), betyder det:

- for bomolie, at de pågældende grænseværdier ikke alle skal være opfyldt samtidig
- for jomfruolie, at olien skal klassificeres i en anden kategori, hvis blot én af disse grænseværdier ikke er opfyldt, men at den fortsat skal klassificeres i en af kategoriene for jomfruolie.

e) Hvis et kvalitetskendtegn er mærket med to asterisker (**), betyder det, at for alle de pågældende olier af olivenpresserester behøver alle grænseværdier ikke være opfyldt samtidig.^a

3) Tillæg 1 ændres således:

a) første led affattes således:

»— Syreindhold	Bilag II	Bestemmelse af indholdet af frie fedtsyrer, kold metode«
----------------	----------	--

b) trettende led affattes således:

»— Mættede fedtsyrer i 2-stil- lingen	Bilag VII	Bestemmelse af indholdet af 2-glycerylmonopalmitat i procent«.
--	-----------	--

4) Overskriften til bilag II affattes således:

»BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF FRIE FEDTSYRER, KOLD METODE«.

5) Bilag IV affattes således:

»BILAG IV

BESTEMMELSE AF VOKSINDHOLD VED GASKROMATOGRAFERING MED KAPILLARKOLONNE

1. GENSTAND

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

2. PRINCIP

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

3. APPARATUR

3.1. 25 ml erlenmeyerkolbe

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

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

3.3.1. termostattyret kolonneovn med temperaturprogrammering

3.3.2. kold injektor til direkte indsprøjtning i kolonnen

3.3.3. en flammeioniseringsdetektor og en konverter-forstærker

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

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

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

- 3.5. elektrisk vibrator
- 3.6. rotationsfordamper
- 3.7. muffelovn
- 3.8. analysevægt med en nøjagtighed på $\pm 0,1$ mg
- 3.9. sædvanligt glasudstyr.
- 4. REAGENSER
- 4.1. silicagel med kornstørrelse 60-200 μm

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

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

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. Fremstilling af kromatografikolonnen

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

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

Bemærkninger:

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

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

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

5.2. Gaskromatografisk analyse

5.2.1. Indledende procedure

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

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

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

5.2.2. Valg af arbejdsbetingelser

Arbejdsbetingelserne er normalt som følger:

— kolonnetemperatur:

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

— detektortemperatur: 350 °C

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

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

— instrumentfølsomhed: skal opfylde nedenstående krav:

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

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

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

5.3. Udførelse af analysen

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

Registreringen fortsættes, indtil alle vokserne er helt elueret.

Basislinjen skal hele tiden opfylde de fastsatte betingelser.

5.4. Identifikation af toppene

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

Figuren viser et kromatogram af vokser fra jomfruolie.

5.5. Kvantitativ vurdering

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

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

$$\text{ester, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1\,000}{A_s \times m}$$

hvor:

A_x = arealet af toppen for den enkelte ester i kvadratmillimeter

A_s = arealet af toppen for den interne standard i kvadratmillimeter

m_s = massen af tilsat intern standard i milligram

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

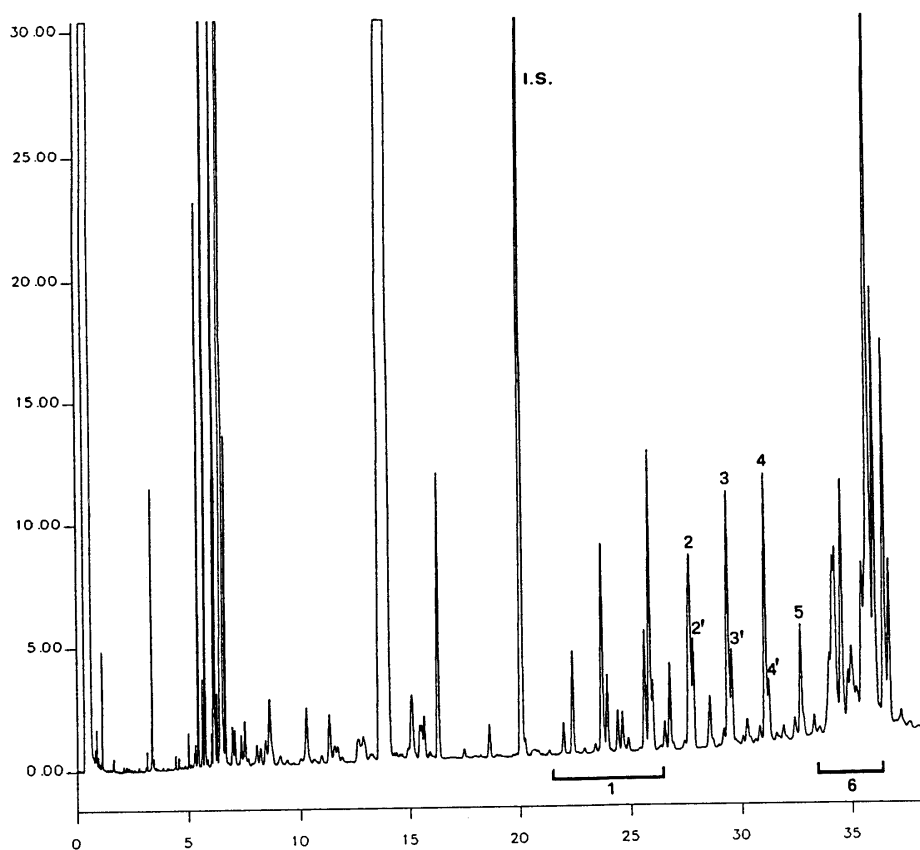
6. ANGIVELSE AF RESULTATER

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

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

Resultaterne angives med en decimal.

Figur

Kromatogram af vokser fra jomfruolie (*)

Signaturer:

I.S. = laurylarachidat

1. = diterpenestere

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

6 = sterolestere og triterpenalkoholer.

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

Tillæg

Bestemmelse af gassens lineære hastighed

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

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

6) Bilag VII affattes således:

»BILAG VII

BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF 2-GLYCERYLMONOPALMITAT I PROCENT

1. GENSTAND OG ANVENDELSESOMRÅDE

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

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

2. PRINCIP

Olieprøven behandles efter forberedelsen med pankreaslipase, som specifikt hydrolyserer triglyceridets 1- og 3-stilling og efterlader 2-monoglycerider. Det procentvise indhold af 2-glycerylmonopalmitat i monoglyceridfraktionen bestemmes efter silylering ved gaskromatografi med kapillarkolonne.

3. APPARATUR OG SÆDVANLIGT Udstyr

- 3.1. 25 ml erlenmeyerkolbe
- 3.2. 100, 250 og 300 ml bægerglas
- 3.3. kromatografikolonne af glas, indvendig diameter 21-23 mm og længde 400 mm, med sintret glasfilter og hane
- 3.4. 10, 50, 100 og 200 ml måleglas
- 3.5. 100 og 250 ml rundbundede kolber
- 3.6. rotationsfordamper
- 3.7. 10 ml centrifugeglas med konisk bund og slibprop
- 3.8. centrifuge til 10 og 100 ml glas
- 3.9. termostat, der kan holde en temperatur på $40 \pm 0,5$ °C
- 3.10. 1 og 2 ml målepipetter
- 3.11. 1 ml injektionssprøjte
- 3.12. 100 µl mikroinjektionssprøjte
- 3.13. 1 000 ml skilletragt
- 3.14. gaskromatograf til kapillarkolonner med kold »on column«-injektor til direkte indsprøjtning af prøven i kolonnen og med en ovn, der kan fastholde den ønskede temperatur inden for ca. 1 °C.
- 3.15. kold »on column«-injektor til direkte indsprøjtning af prøven i kolonnen
- 3.16. flammeioniseringsdetektor og elektrometer
- 3.17. skriver-integrator, der passer til elektrometeret, med responstid højst 1 sekund og variabel papirhastighed
- 3.18. kapillarkolonne af glas eller sintret kvarts, længde 8-12 m og indvendig diameter 0,25-0,32 mm, coatet med 5 % methylpolysiloxan eller phenylmethylpolysiloxan i en lagtykkelse på 0,10-0,30 µm, og brugbar op til 370 °C
- 3.19. 10 µl mikroinjektionssprøjte med hærdet kanyler, længde mindst 7,5 cm, til indsprøjtning direkte i kolonnen.

4. REAGENSER

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

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. **Prøveforberedelse**

- 5.1.1. Olier med under 3 % frie syrer behøver ikke at neutraliseres inden kromatograferingen på silicagelkolonne. Olier med mere end 3 % frie syrer neutraliseres som beskrevet i punkt 5.1.1.1.
- 5.1.1.1. Der anbringes 50 g olie og 200 ml n-hexan i skilletragten på 1 000 ml (3.13). Der tilsættes 100 ml isopropanol og en mængde 12 % natriumhydroxidopløsning (4.11), der svarer til oliens indhold af frie syrer forhøjet med 5 %. Der rystes kraftigt i 1 minut. Derefter tilsættes der 100 ml destilleret vand, og efter fornyet omrystning sættes skilletragten til side.

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

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

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

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

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

5.1.3. *Fremstilling af kromatografikolonnen*

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

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

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

5.1.4. *Kolonnekromatografi*

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

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

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

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

Kolben vejes, og ekstraktmængden udregnes.

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

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

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

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

5.2. **Hydrolyse med pankreaslipase**

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

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

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

5.3. **Fremstilling af silanderivater og gaskromatografi**

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

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

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

5.4. Gaskromatografi

Der anvendes følgende arbejdsbetingelser:

- injektortemperatur (»on column«-injektor) under opløsningsmidlets kogepunkt (68 °C)
- detektortemperatur: 350 °C
- kolonnetemperatur: temperaturprogrammering af ovnen: 60 °C i 1 minut, derefter stigning først med 15 °C pr. minut indtil 180 °C og dernæst med 5 °C pr. minut indtil 340 °C, og endelig 340 °C i 13 minutter
- bæregas: hydrogen eller helium indstillet til en sådan lineær hastighed, at der opnås den i figur 1 viste opløsning. C₅₄-triglyceridet skal have en retentionstid på 40 ± 5 minutter (se figur 2). (Ovenstående arbejdsbetingelser er vejledende. Den enkelte analyseansvarlige må optimere dem for at opnå det ønskede resultat. Højden af toppen for 2-glycerylmonopalmitat skal være mindst 10 % af fuldt udslag på skriveren.)
- indsprøjet mængde: 0,5-1 µl af opløsningen i (5 ml) n-hexan (5.3.3).

5.4.1. Identifikation af toppene

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

5.4.2. Kvantitativ vurdering

Arealerne af toppene beregnes ved hjælp af integratoren.

6. ANGIVELSE AF RESULTATER

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

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

hvor:

A_x = arealet af den top, der svarer til glycerylmonopalmitat

ΣA = summen af arealerne af samtlige monoglyceridtoppe

Resultatet angives med én decimal.

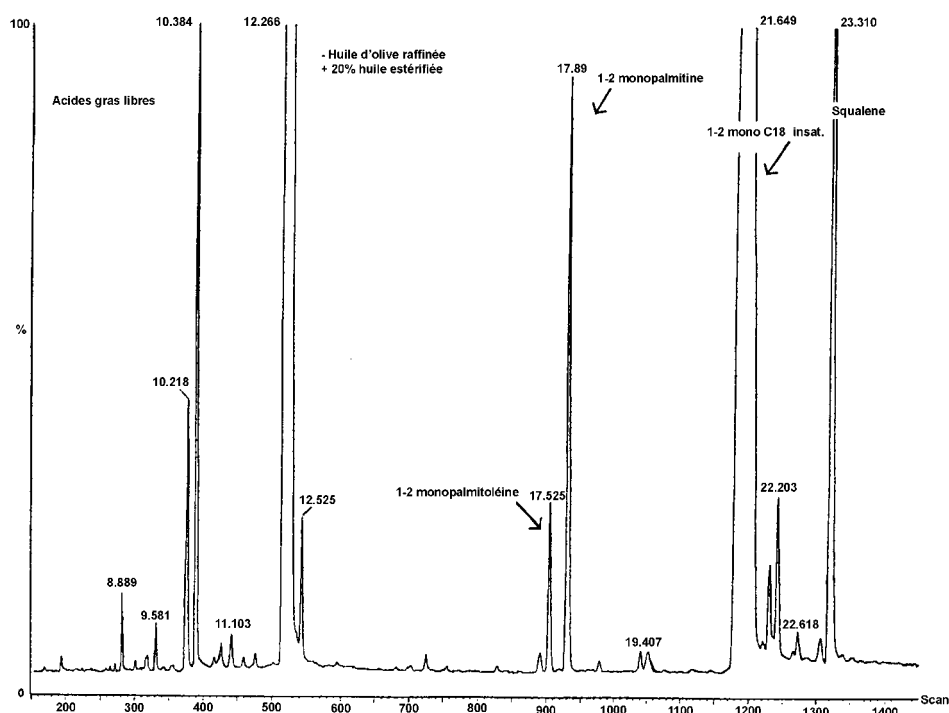
7. ANALYSERAPPORT

Analysereporten skal indeholde følgende:

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

Figur 1

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



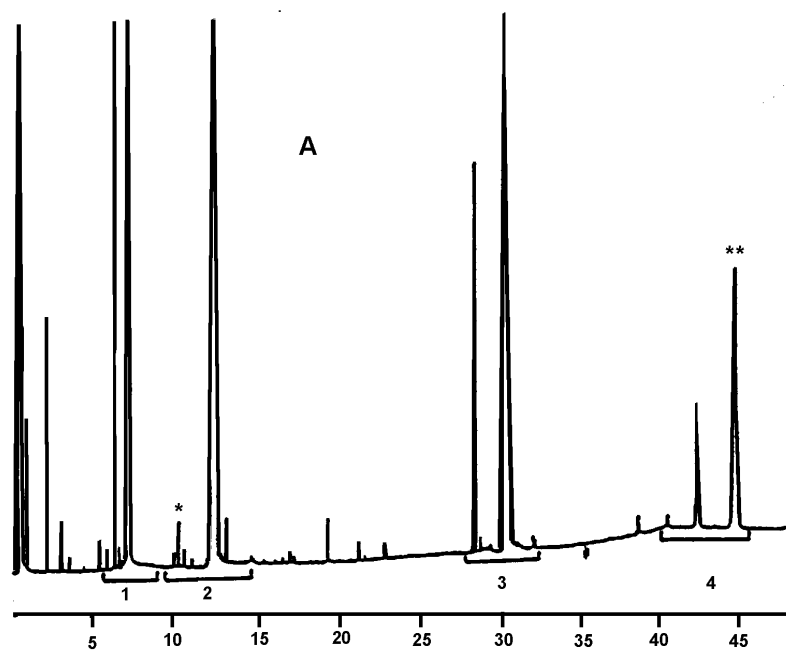
Signaturer: »acides gras libres« = frie fedtsyrer, »huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée« = raffineret olivenolie + 20 % forestret olie, »1-2 monopalmitoléine« = 1-2 monopalmitolein, »1-2 mono C₁₈ insat.« = umættet 1-2 mono-C₁₈.

Figur 2

Kromatogram af:

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

Efter lipasebehandlingen bør triglyceridindholdet ikke være højere end 15 %



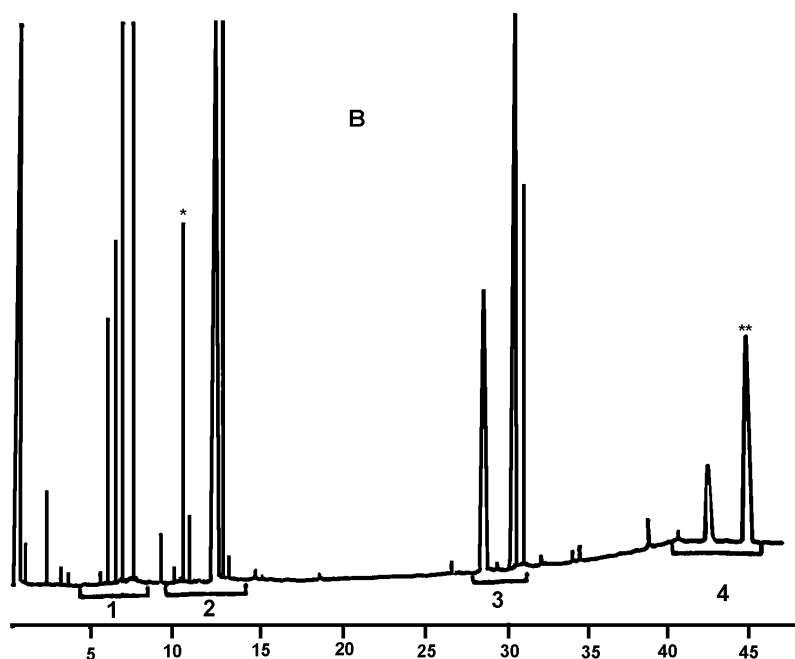
Signaturer:

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

Kromatogram af:

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

Efter lipasebehandlingen bør triglyceridindholdet ikke være højere end 15 %

*Signaturer:*

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

8. NOTER*Note 1. FREMSTILLING AF LIPASE*

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

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

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

Note 2. TEST FOR LIPASEAKTIVITET

Der fremstilles en olivenolieemulsion på følgende måde:

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

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

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

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

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

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

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

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

hvor:

A er aktiviteten i lipaseenheder pr. mg

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

N er natriumhydroxidopløsningens normalitet

m er mængden af tilsat lipase i mg.

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

7) Bilag X A, punkt 6.2, affattes således:

»6.2. Methylestrene fremstilles i overensstemmelse med metode B i bilag X B. Fedtstoffer og olier med et indhold af frie syrer på over 3 % skal på forhånd neutraliseres i overensstemmelse med punkt 5.1.1 i bilag VII.«
