

Den här texten är endast avsedd som ett dokumentationshjälpmedel och har ingen rättslig verkan. EU-institutionerna tar inget ansvar för innehållet. De autentiska versionerna av motsvarande rättsakter, inklusive ingresserna, publiceras i Europeiska unionens officiella tidning och finns i EUR-Lex. De officiella texterna är direkt tillgängliga via länkarna i det här dokumentet

**► B** **KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EEG) nr 2568/91**  
**av den 11 juli 1991**  
**om egenskaper hos olivolja och olivolja av pressrester och om lämpliga analysmetoder**  
 (EGT L 248, 5.9.1991, s. 1)

Ändrad genom:

		Officiella tidningen		
		nr	sida	datum
► <u>M1</u>	Kommissionens förordning (EEG) nr 3682/91 av den 17 december 1991	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u>	Kommissionens förordning (EEG) nr 1429/92 av den 26 maj 1992	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u>	Kommissionens förordning (EEG) nr 1683/92 av den 29 juni 1992	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u>	Kommissionens förordning (EEG) nr 1996/92 av den 15 juli 1992	L 199	18	18.7.1992
► <u>M5</u>	Kommissionens förordning (EEG) nr 3288/92 av den 12 november 1992	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u>	Kommissionens förordning (EEG) nr 183/93 av den 29 januari 1993	L 22	58	30.1.1993
► <u>M7</u>	ändrad genom commission Regulation (EEC) No 826/93 of 6 April 1993 (*)	L 87	6	7.4.1993
► <u>M8</u>	Kommissionens förordning (EEG) nr 620/93 av den 17 mars 1993	L 66	29	18.3.1993
► <u>M9</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 177/94 av den 28 januari 1994	L 24	33	29.1.1994
► <u>M10</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 2632/94 av den 28 oktober 1994	L 280	43	29.10.1994
► <u>M11</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 656/95 av den 28 mars 1995	L 69	1	29.3.1995
► <u>M12</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 2527/95 av den 27 oktober 1995	L 258	49	28.10.1995
► <u>M13</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 2472/97 av den 11 december 1997	L 341	25	12.12.1997
► <u>M14</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 282/98 av den 3 februari 1998	L 28	5	4.2.1998
► <u>M15</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 2248/98 av den 19 oktober 1998	L 282	55	20.10.1998
► <u>M16</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 379/1999 av den 19 februari 1999	L 46	15	20.2.1999
► <u>M17</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 455/2001 av den 6 mars 2001	L 65	9	7.3.2001
► <u>M18</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 2042/2001 av den 18 oktober 2001	L 276	8	19.10.2001
► <u>M19</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 796/2002 av den 6 maj 2002	L 128	8	15.5.2002
► <u>M20</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 1989/2003 av den 6 november 2003	L 295	57	13.11.2003
► <u>M21</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 702/2007 av den 21 juni 2007	L 161	11	22.6.2007
► <u>M22</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 640/2008 av den 4 juli 2008	L 178	11	5.7.2008
► <u>M23</u>	Kommissionens förordning (EU) nr 61/2011 av den 24 januari 2011	L 23	1	27.1.2011
► <u>M24</u>	Kommissionens genomförandeförordning (EU) nr 661/2012 av den 19 juli 2012	L 192	3	20.7.2012

(\*) Denna rättsakt finns inte publicerad på svenska.

---

► <b><u>M25</u></b>	Kommissionens genomförandeförordning (EU) nr 299/2013 av den 26 mars 2013	L 90	52	28.3.2013
► <b><u>M26</u></b>	Kommissionens genomförandeförordning (EU) nr 1348/2013 av den 16 december 2013	L 338	31	17.12.2013
► <b><u>M27</u></b>	Kommissionens delegerade förordning (EU) 2015/1830 av den 8 juli 2015	L 266	9	13.10.2015
► <b><u>M28</u></b>	Kommissionens genomförandeförordning (EU) 2015/1833 av den 12 oktober 2015	L 266	29	13.10.2015
► <b><u>M29</u></b>	Kommissionens genomförandeförordning (EU) 2016/1227 av den 27 juli 2016	L 202	7	28.7.2016

**▼B****KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EEG) nr 2568/91****av den 11 juli 1991****om egenskaper hos olivolja och olivolja av pressrester och om lämpliga analysmetoder****▼M20***Artikel 1*

1. Oljor vars egenskaper överensstämmer med dem som anges i punkterna 1 och 2 i bilaga I till denna förordning skall anses vara jungfruolja i den mening som avses i punkt 1 a och 1 b i bilagan till förordning nr 136/66/EEG.

2. Olja vars egenskaper överensstämmer med dem som anges i punkt 3 i bilaga I till denna förordning skall anses vara bomolja i den mening som avses i punkt 1 c i bilagan till förordning nr 136/66/EEG.

3. Olja vars egenskaper överensstämmer med dem som anges i punkt 4 i bilaga I till denna förordning skall anses vara raffinerad olivolja i den mening som avses i punkt 2 i bilagan till förordning nr 136/66/EEG.

4. Olja vars egenskaper överensstämmer med dem som anges i punkt 5 i bilaga I till denna förordning skall anses vara olivolja sammansatt av raffinerad olivolja och jungfruolja i den mening som avses i punkt 3 i bilagan till förordning nr 136/66/EEG.

5. Olja vars egenskaper överensstämmer med dem som anges i punkt 6 i bilaga I till denna förordning skall anses vara oraffinerad olja av olivrestprodukter i den mening som avses i punkt 4 i bilagan till förordning nr 136/66/EEG.

6. Olja vars egenskaper överensstämmer med dem som anges i punkt 7 i bilaga I till denna förordning skall anses vara raffinerad olja av olivrestprodukter i den mening som avses i punkt 5 i bilagan till förordning nr 136/66/EEG.

7. Olja vars egenskaper överensstämmer med dem som anges i punkt 8 i bilaga I till denna förordning skall anses vara olivolja av olivrestprodukter i den mening som avses i punkt 6 i bilagan till förordning nr 136/66/EEG.

**▼ M26***Artikel 2*

1. De egenskaper hos oljor som fastställs i bilaga I ska bestämmas med följande analysmetoder:

- a) För bestämning av fria fettsyror, uttryckta som procent oljesyra, den metod som anges i bilaga II.
- b) För bestämning av peroxidtal, den metod som anges i bilaga III.
- c) För bestämning av vaxhalt, den metod som anges i bilaga IV.
- d) För bestämning av sammansättningen och halten av steroler och triterpendialkoholer med kapillärgaskromatografi, den metod som anges i bilaga V.
- e) För bestämning av andelen 2-glycerylmonopalmitat, den metod som anges i bilaga VII.
- f) För spektrofotometri, den metod som anges i bilaga IX.

**▼ M28**

- g) För bestämning av fettsyrasammansättning, den metod som anges i bilaga X.

**▼ M26**

- h) För bestämning av flyktiga, halogenerade lösningsmedel, den metod som anges i bilaga XI.
- i) För utvärdering av organoleptiska egenskaper hos jungfruolja, den metod som anges i bilaga XII.
- j) För bestämning av stigmastadiener, den metod som anges i bilaga XVII.
- k) För bestämning av triglyceridhalt enligt ECN 42, den metod som anges i bilaga XVIII.

**▼ M28**

- l) För bestämning av halten av alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer, den metod som anges i bilaga XIX.

**▼ M26**

- m) För bestämning av halterna av vaxer, fettsyrametylestrar och fettsyraetylestrar, den metod som anges i bilaga XX.

**▼ M28**

\_\_\_\_\_

**▼ M26**

2. Den granskning som nationella myndigheter eller deras företrädare utför av organoleptiska egenskaper hos jungfruolja ska genomföras av paneler som godkänts av medlemsstaterna.

**▼ M26**

De organoleptiska egenskaper hos en olivolja som avses i första stycket ska anses överensstämma med den angivna kategorin om en panel som godkänts av den berörda medlemsstaten bekräftar denna klassificering.

Om panelen beträffande de organoleptiska egenskaperna inte bekräftar den kategori som angivits för olivoljan, ska de nationella myndigheterna eller deras företrädare, på begäran av den berörda parten, utan dröjsmål låta andra godkända paneler göra två kontrollbedömningar, varav minst en ska utföras av en panel som godkänts av den berörda producentmedlemsstaten. Egenskaperna ska anses överensstämma med de angivna egenskaperna om båda kontrollbedömningarna bekräftar den angivna klassificeringen. Om så inte är fallet ska den berörda parten stå för kostnaden för kontrollbedömningarna.

3. När det gäller de nationella myndigheternas eller deras företrädares granskningar av att oljorna har de egenskaper som föreskrivs i punkt 1, ska proverna tas i enlighet med de internationella standarderna EN ISO 661 beträffande provberedning och EN ISO 5555 beträffande provtagning. Utan hinder av vad som sägs i punkt 6.8 i standard EN ISO 5555 ska emellertid proverna från partier av nämnda oljor i detaljhandelsförpackningar tas i enlighet med bilaga Ia till denna förordning. När det gäller oljor i bulk för vilka provtagningen inte kan utföras i enlighet med EN ISO 5555, ska provtagningen utföras i enlighet med anvisningar som fastställts av den behöriga myndigheten i medlemsstaten.

Utan att det påverkar tillämpningen av standarden EN ISO 5555 och kapitel 6 i standarden EN ISO 661, ska proverna så snabbt som möjligt skyddas mot ljus och höga temperaturer och skickas till laboratorieanalys senast fem arbetsdagar efter provtagning, eller bevaras på ett sådant sätt att de inte bryts ner eller skadas under transport eller lagring innan de skickas till laboratorium.

4. För utförandet av den kontroll som föreskrivs i punkt 3 ska de analyser som avses i bilagorna II, III, IX, XII och XX, samt de eventuella kontrollanalyser som föreskrivs i de nationella lagstiftningarna, utföras före bästföredatum om det rör sig om förpackade produkter. När det gäller provtagning av oljor i bulk ska analyserna utföras senast sex månader efter den månad då provet togs.

Ingen tidsfrist ska tillämpas för de övriga analyser som föreskrivs i denna förordning.

Om resultatet av analyserna inte stämmer överens med egenskaperna för den kategori olivolja eller olivolja av pressrester som uppgetts, utom om provtagningen gjorts mindre än två månader före minsta hållbarhetsdatum, ska den berörda parten underrättas om detta minst en månad före utgången av den tidsfrist som avses i första stycket.

**▼ M26**

5. För olivoljeegenskaper som fastställs med metoderna i punkt 1 första stycket ska analysresultaten direkt jämföras med de gränser som föreskrivs i den här förordningen.

**▼ M25***Artikel 2a*

1. Vid tillämpningen av denna artikel ska med *saluförd olivolja* avses den totala kvantitet olivolja och olivolja av pressrester från en viss medlemsstat som konsumeras i den medlemsstaten eller exporteras från den medlemsstaten.

2. Medlemsstaterna ska se till att kontroller av överensstämmelse utförs selektivt, baserat på en riskanalys, och med lämplig intervall, så att man säkrar att den olivolja som saluförs överensstämmer med den deklarerade kategorin.

3. Riskanalysen kan omfatta följande kriterier:

a) Kategori av olja, produktionsperiod, priset på oljor i förhållande till andra vegetabiliska oljor, blandning och förpackning, lagringsanläggningar och lagringsförhållanden, ursprungsland, destinationsland, transportmedel och partiets volym.

b) Aktörernas position i saluföringskedjan, den volym och/eller det värde som de saluför, de olika kategorier av oljor de saluför, den typ av verksamhet som utförs, t.ex. pressning, lagring, raffinering, blandning, förpackning eller återförsäljning.

c) Resultaten från tidigare kontroller, inklusive antal och typ av konstaterade brister, gängse kvalitet på de saluförda oljorna eller nivå på den tekniska utrustning som används.

d) Tillförlitligheten hos aktörernas kvalitetssäkringssystem eller system för egenkontroll vad avser överensstämmelsen med handelsnormerna.

e) Den plats där kontrollen utförs, i synnerhet om det är den första införselplatsen till unionen, sista utförselplatsen från unionen eller den plats där oljorna produceras, förpackas, lastas eller säljs till slutkonsumenten.

f) Varje annan uppgift som kan utgöra tecken på att det finns en risk för bristande överensstämmelse.

4. Medlemsstaterna ska i förväg fastställa

a) kriterier för bedömning av risken för att partier inte överensstämmer med normerna,

b) på grundval av en riskanalys för varje kategori, det minsta antalet aktörer eller partier och/eller kvantiteter som ska omfattas av en kontroll av överensstämmelse.

**▼ M25**

Minst en kontroll av överensstämmelse ska utföras per år och per tusen ton saluförd olivolja i medlemsstaten.

5. Medlemsstaten ska kontrollera överensstämmelsen genom att
  - a) i valfri ordning genomföra de analyser som föreskrivs i bilaga I, eller
  - b) följa den ordning som anges i beslutsschemat i bilaga Ib till dess att man når fram till ett av de beslut som anges i beslutsschemat.

**▼ M19****▼ M25***Artikel 3*

Om det fastställs att en olja inte överensstämmer med kategoribeskrivningen, ska den berörda medlemsstaten, utan att det påverkar eventuella andra sanktioner, tillämpa effektiva, proportionella och avskräckande sanktioner som ska bestämmas mot bakgrund av hur allvarlig den konstaterade överträdelsen är.

Om det vid kontrollerna konstateras betydande oegentligheter ska medlemsstaterna öka antalet kontroller avseende försäljningsled, kategori av olja, ursprung eller andra kriterier.

**▼ M5***Artikel 4***▼ M19**

1. Medlemsstaterna kan godkänna provsmakningspaneler för de nationella myndigheternas eller deras företrädares bedömning och kontroll av de organoleptiska egenskaperna.

Villkoren för godkännande skall fastställas av medlemsstaterna, på ett sådant sätt att

- de motsvarar villkoren i bilaga 12.4,
- det säkerställs att panelens ordförande har utbildats vid en inrättning, och under förhållanden, som godkänts av medlemsstaten,
- godkännandets giltighet är avhängig av de resultat som erhålls genom ett system för årliga kontroller som medlemsstaten upprättat.

Varje medlemsstat skall delge kommissionen en förteckning över de godkända panelerna samt meddela vilka åtgärder som vidtagits i enlighet med denna punkt.

**▼ M5**

2. Om medlemsstaterna har svårigheter att upprätta smakpaneler inom sitt territorium, får de anlita en smakpanel som är godkänd i en annan medlemsstat.

3. Varje medlemsstat skall upprätta en förteckning över smakpaneler som har upprättats av yrkes- eller branschorganisationer enligt de villkor som fastställs i punkt 1 och skall säkerställa att dessa villkor uppfylls.

**▼ M19****▼ B***Artikel 6*

1. Oljehalten i oljekakor och andra rester som erhållits vid extraktion av olivolja (KN-nr 2306 90 11 och 2306 90 19) skall bestämmas med användning av den metod som anges i bilaga 15.

**▼ B**

2. Den oljehalt som anges i punkt 1 skall uttryckas som viktprocent olja i förhållande till torrsubstans.

**▼ M20***Artikel 7*

Gemenskapens bestämmelser om förekomst av föroreningar skall tillämpas.

Beträffande halten av halogenerade lösningsmedel gäller följande gränsvärden för samtliga kategorier av olivolja:

— Högsta tillåtna halt av varje påvisat halogenerat lösningsmedel: 0,1 mg/kg

— Högsta tillåtna total halt av påvisade halogenerade lösningsmedel: 0,2 mg/kg.

**▼ M25***Artikel 7a*

Fysiska eller juridiska personer och grupper av personer som av någon form av professionella eller kommersiella skäl innehar olivolja eller olivolja av pressrester från utvinningen vid olivpressen fram till och med buteljeringsstadiet, ska vara skyldiga att föra register över inkommande eller utgående varor för varje kategori av sådan olja.

Medlemsstaterna ska se till att skyldigheten enligt första stycket uppfylls på vederbörligt sätt.

*Artikel 8*

1. Medlemsstaterna ska meddela kommissionen de åtgärder som genomför denna förordning. De ska informera kommissionen om alla efterföljande ändringar.

2. Medlemsstaterna ska senast den 31 maj varje år överlämna en rapport till kommissionen om genomförandet av denna förordning under det föregående kalenderåret. Rapporten ska minst innehålla resultaten av de kontroller av överensstämmelse som utförts avseende olivoljor enligt de mallar som fastställs i bilaga XXI.

3. De meddelanden som avses i denna förordning ska lämnas i enlighet med kommissionens förordning (EG) nr 792/2009 <sup>(1)</sup>.

**▼ B***Artikel 9*

Förordning (EEG) nr 1058/77 skall upphöra att gälla.

*Artikel 10*

1. Denna förordning träder i kraft den tredje dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*. Den metod som anges i bilaga 12 skall emellertid tillämpas från ► **M1** den 1 november 1992 ◀, utom då det gäller åtgärder i samband med interventionssystemet.

<sup>(1)</sup> EUT L 228, 1.9.2009, s. 3.



▼ **M5**

Den metoden skall inte tillämpas för jungfruolja som iordningställs för marknaden före den 1 november 1992

▼ **B**

2. Denna förordning skall inte tillämpas på olivolja och olivolja av pressrester som är förpackad före denna förordnings ikraftträdande och saluförs fram till och med den 31 oktober 1992.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

**▼ B***BILAGOR***Sammanfattning**

Bilaga I	Egenskaper hos olivolja
Bilaga Ia	Provtagning av olivolja och olivolja av pressrester som levereras i detaljhandelsförpackningar
Bilaga Ib	Bestlutsschema för kontroll av att ett prov av olivolja överensstämmer med den kategori som uppgetts
Bilaga II	Bestämning av fria fettsyror, metod vid låg temperatur
Bilaga III	Bestämning av peroxidvärdet
Bilaga IV	Bestämning av vaxhalt med kapillärgaskromatografi
Bilaga V	Bestämning av sammansättningen och halten av steroler och triterpenalkoholer genom gaskromatografi med kapillärkolonn
Bilaga VII	► <b>M21</b> Bestämning av procentandelen 2-glycerylmonopalmitat ◀

**▼ M20****▼ B**

Bilaga IX	Spektrofotometrisk undersökning i ultraviolett ljus
-----------	---

**▼ M28**

Bilaga X	Bestämning av fettsyrametylestrar med gaskromatografi
----------	---

**▼ B**

Bilaga XI	Bestämning av halten flyktiga halogenerade lösningsmedel i olivolja
Bilaga XII	Internationella olivoljerådets metod för organoleptisk bedömning av jungfruolja

**▼ M20****▼ M19****▼ B**

Bilaga XV	Oljehalt i pressrester av oliver
Bilaga XVI	Bestämning av jodtal
Bilaga XVII	Metod för bestämning av stigmastadiener i vegetabiliska oljor
Bilaga XVIII:	Bestämning av skillnaden mellan faktiskt och teoretiskt innehåll av triglycerider med ECN 42
Bilaga XIX:	► <b>M28</b> Bestämning av halten alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer med kapillärgaskromatografi ◀

**▼ M23**

Bilaga XX:	Metod för bestämning av halter av vaxer, fettsyremetylestrar och fettsyremetylestrar med kapillärgaskromatografi
------------	--

**▼ M28****▼ M25**

Bilaga XXI:	Resultat av kontroller av överensstämmelse som utförs på olivolja enligt artikel 8.2
-------------	--

## BILAGA I

## EGENSKAPER HOS OLIVOLJA

Kategori	Fettsyraetystrar (FAEE) (*)	Syrhalt (%) (*)	Peroxidtal mEq O <sub>2</sub> /kg (*)	Vaxer mg/kg (**)	2-glycerilmonopalmitat (%)	Stigmastadiener mg/kg (†)	Skilnader: ECN 42 (HPLC) och ECN 42 (teoretisk beräkning)	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>268</sub> eller K <sub>270</sub> (*)	Delta-K (*)	Organoleptisk bedömning Defekternas medianvärde (Md) (*)	Organoleptisk bedömning Medianvärde för fruktighet (Mf) (*)
1. Extra jungfruolja	FAEE ≤ 40 mg/kg (skördeåret 2013–2014) (²) FAEE ≤ 35 mg/kg (skördeåren 2014–2016) FAEE ≤ 30 mg/kg (skördeåren efter 2016)	≤ 0,8	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9 om totalhalten palmitinsyra ≤ 14 %	≤ 0,05	≤  0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 om totalhalten palmitinsyra > 14 %							
2. Jungfruolja	—	≤ 2,0	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9 om totalhalten palmitinsyra ≤ 14 %	≤ 0,05	≤  0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 om totalhalten palmitinsyra > 14 %							

▼ M27

Kategori	Fettsyraetystrar (FAEE) (*)	Syrhalt (%) (*)	Peroxidtal mEq O <sub>2</sub> /kg (*)	Vaxer mg/kg (**)	2-glycerilmonopalmittat (%)	Stigmastadiener mg/kg (1)	Skillnader: ECN 42 (HPLC) och ECN 42 (teoretisk beräkning)	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>268</sub> eller K <sub>270</sub> (*)	Delta-K (*)	Organoleptisk bedömning Defekternas medianvärde (Md) (*)	Organoleptisk bedömning Medianvärde för fruktighet (Mf) (*)
3. Bomolja	—	> 2,0	—	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 300 (3)	≤ 0,9 om totalhalten palmitinsyra ≤ 14 %	≤ 0,50	≤  0,3	—	—	—	Md > 3,5 (4)	—
					≤ 1,1 om totalhalten palmitinsyra > 14 %							
4. Raffinerad olivolja	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 om totalhalten palmitinsyra ≤ 14 %	—	≤  0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 om totalhalten palmitinsyra > 14 %							
5. Olivolja bestående av raffinerad olivolja och jungfruolja	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 om totalhalten palmitinsyra ≤ 14 %	—	≤  0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0 om totalhalten palmitinsyra > 14 %							

▼ M27

Kategori	Fettsyraetystrar (FAEE) (*)	Syrhalt (%) (*)	Peroxidtal mEq O <sub>2</sub> /kg (*)	Vaxer mg/kg (**)	2-glycerilmonopalmittat (%)	Stigmastadiener mg/kg (1)	Skillnader: ECN 42 (HPLC) och ECN 42 (teoretisk beräkning)	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>268</sub> eller K <sub>270</sub> (*)	Delta-K (*)	Organoleptisk bedömning Defekternas medianvärde (Md) (*)	Organoleptisk bedömning Medianvärde för fruktighet (Mf) (*)
6. Oraffinerad olivolja av pressrester	—	—	—	C40 + C42 + C44 + C46 > 350 (5)	≤ 1,4	—	≤  0,6	—	—	—	—	—
7. Raffinerad olivolja av pressrester	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,4	—	≤  0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Olivolja av pressrester	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,2	—	≤  0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Totalvärde för isomerer som kan (eller inte kan) separeras på kapillärkolonn.

(2) Gränsen gäller olivolja producerad från och med den 1 mars 2014.

(3) Olja med en vaxhalt mellan 300 och 350 mg/kg betraktas som bomolja om totalhalten alifatiska alkoholer är lägre än eller lika med 350 mg/kg eller om halten erytrodiol och uvaol är lägre än eller lika med 3,5 %.

(4) Medianvärdet för defekter kan vara lägre än eller lika med 3,5 och medianvärdet för fruktighet lika med 0.

(5) Olja med en vaxhalt mellan 300 och 350 mg/kg betraktas som oraffinerad olivolja av pressrester om totalhalten alifatiska alkoholer är högre än 350 mg/kg och om halten erytrodiol och uvaol är högre än 3,5 %.

▼ M27

Kategori	Fettsyrasammansättning (¹)						Totalt transolein-isomerer (%)	Totalt isomerer av translinolsyra + isomerer av translinolensyra (%)	Sterolsammansättning						Summa steroler (mg/kg)	Erytrodiol och uvaol (%) (**)
	Myristinsyra (%)	Linolensyra (%)	Eikosan-syra (arakin-syra) (%)	Eikosen-syra (%)	Behen-syra (%)	Lignoce-rinsyra (%)			Koleste-rol (%)	Brassi-kasterol (%)	Kampe-sterol (²) (%)	Stigmasterol (%)	App βsito-sterol (³) (%) (**)	Delta-7-stigmaste-nol (²) (%)		
1. Extra jungfruolja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Jungfruolja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Bomolja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (⁴)
4. Raffinerad olivolja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Olivolja bestående av raffinerad olivolja och jungfruolja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Oraffinerad olivolja av pressrester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (⁵)
7. Raffinerad olivolja av pressrester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5

▼ M27

Kategori	Fettsyrasammansättning <sup>(1)</sup>						Totalt transolein-isomerer (%)	Totalt isomerer av translinolsyra + isomerer av translinolensyra (%)	Sterolsammansättning						Summa steroler (mg/kg)	Erytrodiol och uvaol (%) (**)
	Myristinsyra (%)	Linolensyra (%)	Eikosan-syra (arakin-syra) (%)	Eikosen-syra (%)	Behen-syra (%)	Lignoce-rinsyra (%)			Koleste-rol (%)	Brassi-kasterol (%)	Kampe-sterol <sup>(2)</sup> (%)	Stigmasterol (%)	App βsito-sterol <sup>(3)</sup> (%) (**)	Delta-7-stigmaste-nol <sup>(2)</sup> (%)		
8. Olivolja av pressrester	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

<sup>(1)</sup> Halt av övriga fettsyror (%): palmitinsyra: 7,50–20,00; palmitoleinsyra: 0,30–3,50; heptadekansyra: ≤ 0,30; heptadekensyra: ≤ 0,30; stearinsyra: 0,50–5,00; oljesyra: 55,00–83,00; linolsyra: 2,50–21,00.

<sup>(2)</sup> Se tillägget till denna bilaga.

<sup>(3)</sup> App β-sitosterol: Delta-5,23-stigmastadienol + klerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadienol.

<sup>(4)</sup> Olja med en vaxhalt mellan 300 och 350 mg/kg betraktas som bomolja om totalhalten alifatiska alkoholer är lägre än eller lika med 350 mg/kg eller om halten erytrodiol och uvaol är lägre än eller lika med 3,5 %.

<sup>(5)</sup> Olja med en vaxhalt mellan 300 och 350 mg/kg betraktas som raffinerad olivolja av pressrester om totalhalten alifatiska alkoholer är högre än 350 mg/kg eller om halten erytrodiol och uvaol är högre än 3,5 %.

Anm.:

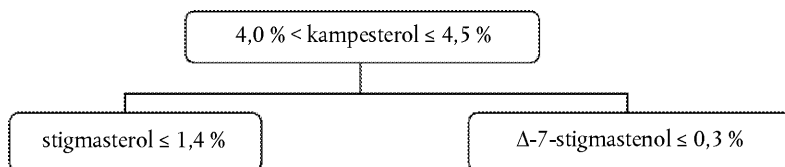
- Analysresultaten ska anges med samma antal decimalers noggrannhet som anges för varje egenskap. Den sista siffran ska avrundas uppåt om efterföljande siffra är högre än 4.
- Det räcker med att en enda av egenskaperna inte motsvarar det angivna värdet för att en olja ska klassas i en annan kategori eller förklaras ej uppfylla renhetskraven enligt denna förordning.
- Egenskaper markerade med asterisk (\*) och som avser oljans kvalitet anger – för bomolja, att båda gränsvärdena samtidigt får skilja sig från de angivna värdena, – för jungfruolja, att oljan måste byta kategori om ett eller flera av dessa gränsvärden inte är uppfyllt, men att den förblir klassad inom en kategori för jungfruolja.
- Egenskaper markerade med två asterisker (\*\*) anger, för all olivolja av pressrester, att båda gränsvärdena samtidigt får skilja sig från de angivna värdena.

▼ M27

## Tillägg

**BESLUTSSCHEMA**

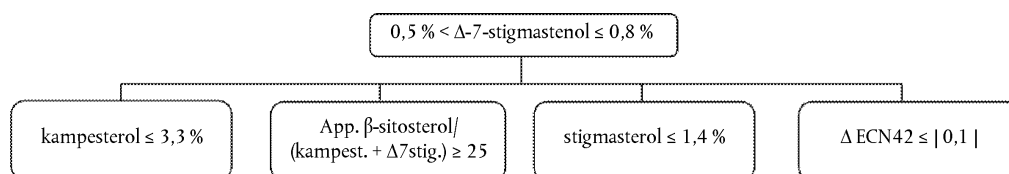
Beslutsschema avseende **kampesterol** för jungfruolja och extra jungfruolja:



Övriga parametrar ska uppfylla de gränsvärden som fastställs i denna förordning.

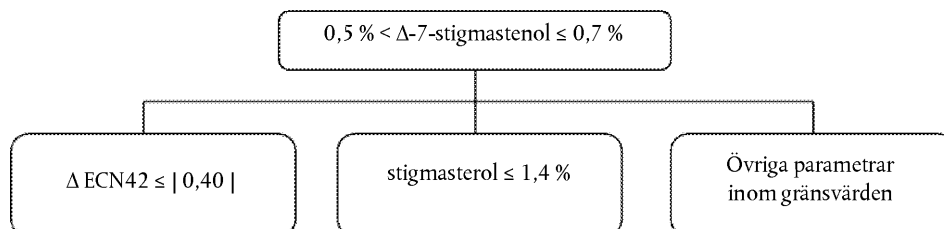
Beslutsschema avseende **delta-7-stigmastenol** för

— Extra jungfruolja och jungfruolja



Övriga parametrar ska uppfylla de gränsvärden som fastställs i denna förordning.

— Olivolja av pressrester (oraffinerad och raffinerad)





▼ **M26***BILAGA Ia***PROVTAGNING AV OLIVOLJA OCH OLIVOLJA AV PRESSRESTER  
SOM LEVERERAS I DETALJHANDELSFÖRPACKNINGAR**

Denna metod för provtagning tillämpas på partier av olivolja och olivolja av pressrester i detaljhandelsförpackningar. Olika provtagningsmetoder tillämpas beroende på om detaljhandelsförpackningen innehåller mer än 5 liter eller inte.

Med parti avses ett antal försäljningsenheter som producerats, framställts och förpackats under sådana förhållanden att oljan i var och en av dessa enheter kan anses vara homogen med avseende på samtliga analyssegenskaper. Identifieringen av ett parti ska ske i enlighet med Europaparlamentets och rådets direktiv 2011/91/EU <sup>(1)</sup>.

Med delprov avses den volym olja som ingår i en detaljhandelsförpackning och tas från ett slumpvis utvalt ställe i partiet.

**1. PARTIDELPROVETS INNEHÅLL****1.1. Detaljhandelsförpackningar om högst 5 liter**

Med partidelprov för detaljhandelsförpackningar om högst 5 liter avses antalet delprov som tagits från ett parti i enlighet med tabell 1.

*Tabell 1***Ett partidelprov ska åtminstone omfatta följande**

Om detaljhandelsförpackningen rymmer	Ska partidelprovet omfatta olja från
a) minst 1 liter	a) 1 detaljhandelsförpackning
b) mindre än 1 liter	b) det lägsta antal förpackningar som krävs för att uppnå en total volym på minst 1,0 liter

Det antal förpackningar som avses i tabell 1 och som ska utgöra ett partidelprov kan ökas av varje medlemsstat i enlighet med dess egna behov (t.ex. om en organoleptisk bedömning utförs av ett annat laboratorium än det som gjorde de kemiska analyserna, kontrollanalysen, osv.).

**1.2. Detaljhandelsförpackningar som överstiger 5 liter**

Med partidelprov för detaljhandelsförpackningar som överstiger 5 liter avses en representativ del av det totala delprovet, vilken erhålls genom ett reduktionsförfarande och i enlighet med tabell 2. Partidelprovet måste bestå av flera exempel.

Med exempel av ett partidelprov avses var och en av de förpackningar som utgör partidelprovet.

*Tabell 2***Minsta antalet delprover som ska väljas ut**

Antal förpackningar i varje parti	Minsta antal delprover som ska väljas ut
Upp till 10	1
Fr.o.m. ... 11 t.o.m. 150	2

<sup>(1)</sup> Europaparlamentets och rådets direktiv 2011/91/EU av den 13 december 2011 om identifieringsmärkning av livsmedelspartier (EUT L 334, 16.12.2011, s. 1).

▼ **M26**

Antal förpackningar i varje parti	Minsta antal delprover som ska väljas ut
Fr.o.m. ... 151 t.o.m. 500	3
Fr.o.m. ... 501 t.o.m. 1 500	4
Fr.o.m. ... 1 501 t.o.m. 2 500	5
> 2 500 per 1 000 förpackningar	1 extra delprov

För att minska volymen av förpackningar homogeniseras innehållet i delproverna för beredningen av partidelprovet. De olika delproven hålls i en gemensam behållare för homogenisering genom omrörning, så att de bäst skyddas från luften.

Innehållet i partidelprovet ska hållas i flera förpackningar med en kapacitet på minst 1,0 liter som var och en utgör ett exempel av partidelprovet.

Antalet partidelprover kan ökas av varje medlemsstat i enlighet med dess egna behov (t.ex. om en organoleptisk bedömning utförs av ett annat laboratorium än det som gjorde de kemiska analyserna, kontrollanalysen, osv.).

Varje förpackning måste fyllas på ett sätt som minimerar luftlagret längst upp och sedan lämpligt förslutas och förseglas för att säkerställa att produkten är skyddad mot åverkan.

Dessa exempel ska märkas för att säkerställa en korrekt identifiering.

## 2. ANALYSER OCH RESULTAT

- 2.1. Varje partidelprov ska delas upp i laboratorieprover enligt punkt 2.5 i standarden EN ISO 5555 och analyseras enligt ordningsföljden i det beslutschema som anges i bilaga Ib eller i någon annan slumpmässig ordning.
- 2.2. Om samtliga analysresultat överensstämmer med egenskaperna för den kategori olja som uppgetts, ska hela partiet förklaras överensstämma med gällande krav.

Om ett enskilt analysresultat inte överensstämmer med egenskaperna för den kategori olja som uppgetts, ska hela partiet förklaras inte överensstämma med gällande krav.

## 3. KONTROLL AV VILKEN KATEGORI PARTIET TILLHÖR

- 3.1. För att kontrollera vilken kategori ett parti tillhör får den behöriga myndigheten öka det antal partidelprover som tas i olika delar av partiet i enlighet med följande tabell:

Tabell 3

### Antal partidelprov beroende på partiets storlek

Partiets storlek (liter)	Antal partidelprover
Färre än 7 500	2
Från 7 500 till 25 000	3
Från 25 000 till 75 000	4
Från 75 000 till 125 000	5
Från 125 000 och uppåt	6 + 1 för varje ytterligare 50 000 liter

**▼M26**

Varje delprov som utgör ett partidelprov ska tas från ett sammanhängande ställe i partiet. Det är nödvändigt att notera platsen för varje partidelprov och märka det på ett entydigt sätt.

Framställningen av varje partidelprov ska utföras enligt de förfaranden som anges i punkterna 1.1 och 1.2.

Varje partidelprov ska sedan underkastas de analyser som avses i artikel 2.1.

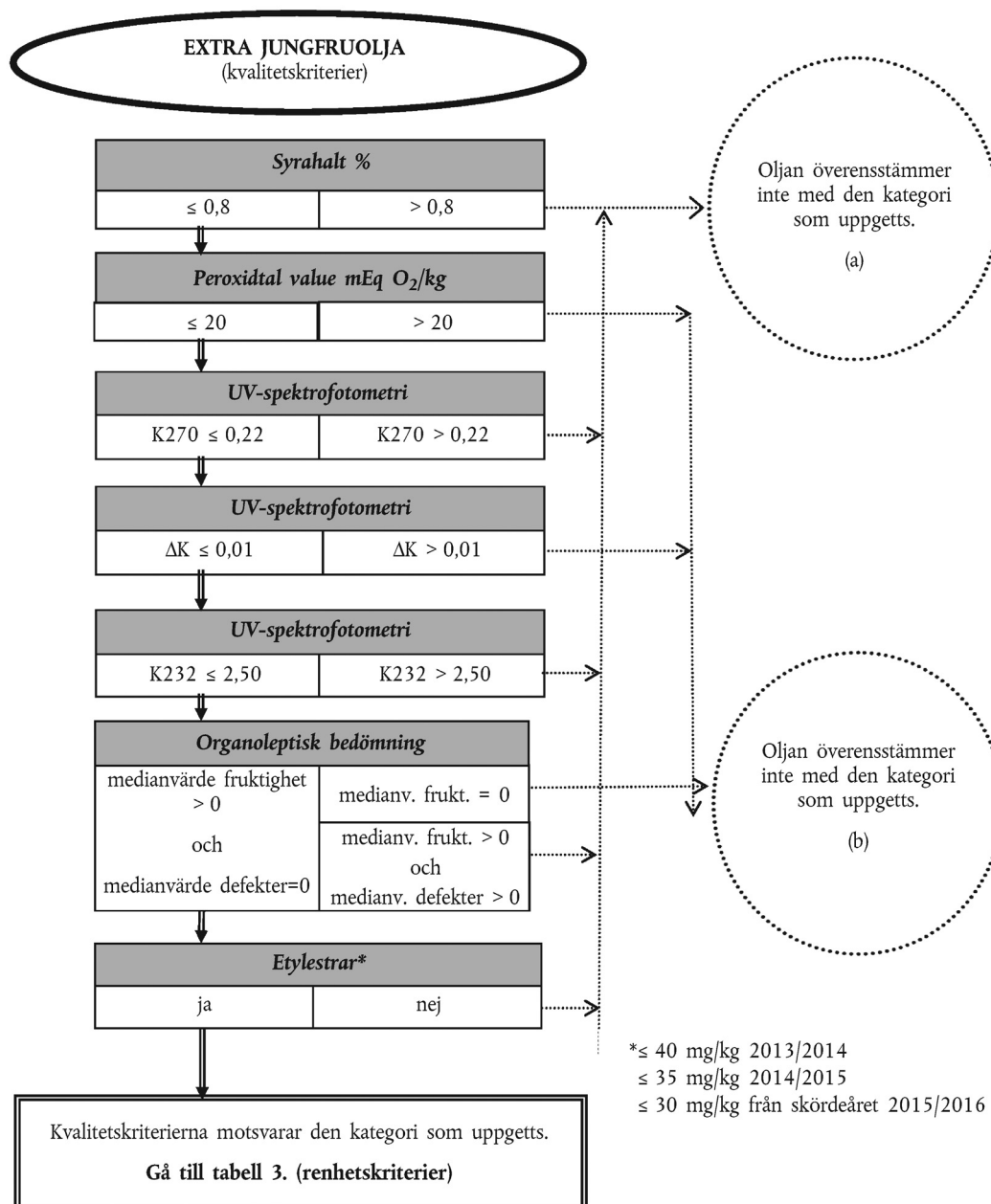
- 3.2. När ett av resultaten av de analyser som avses i artikel 2.1 på minst ett partidelprov inte överensstämmer med egenskaperna för den kategori olja som uppgetts, ska hela partiet förklaras inte överensstämma med gällande krav.

▼ M26

## BILAGA Ib

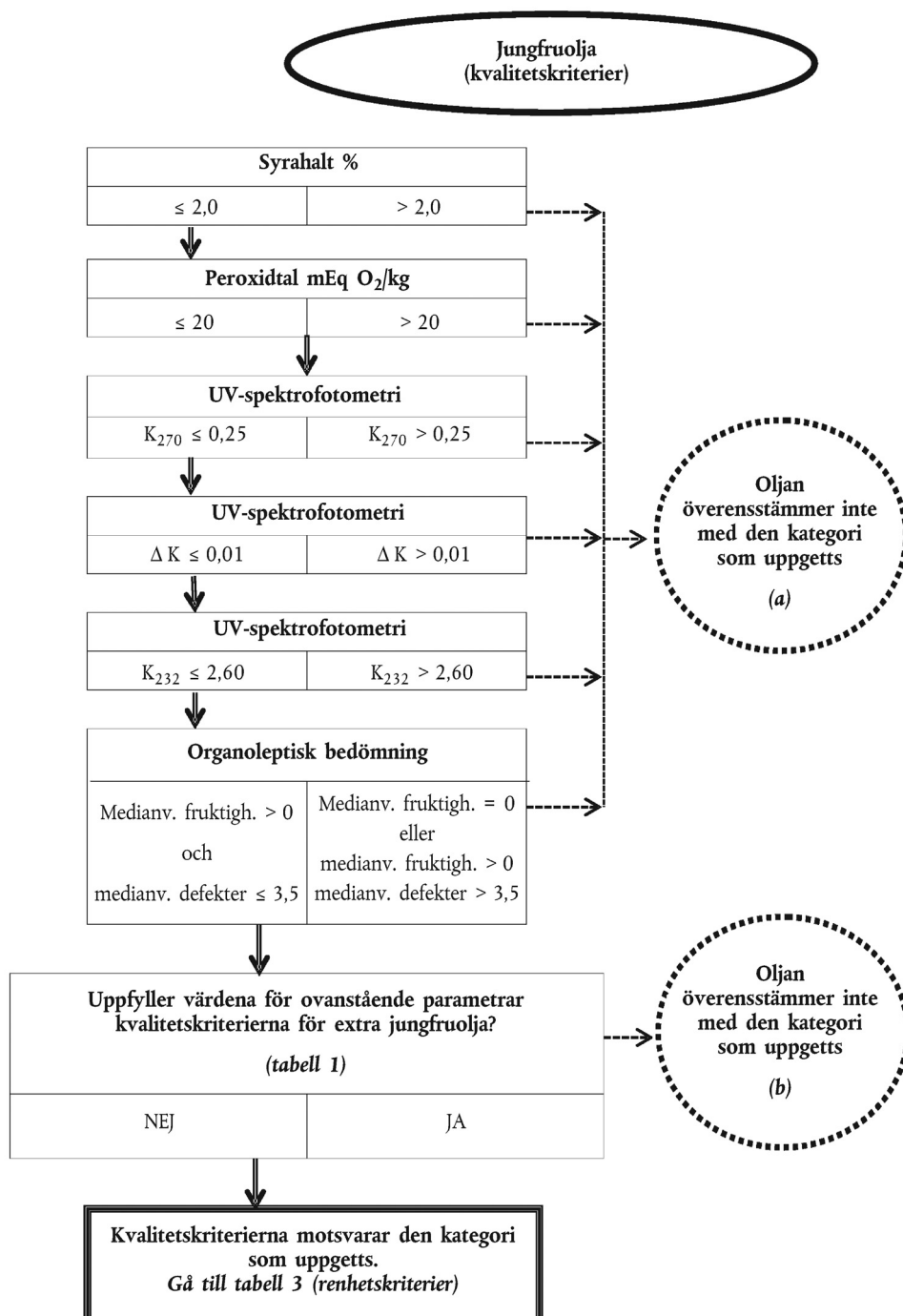
## BESLUTSSCHEMA FÖR KONTROLL AV ATT ETT PROV AV OLIVOLJA ÖVERENSSTÄMMER MED DEN KATEGORI SOM UPPGETTS

Tabell 1



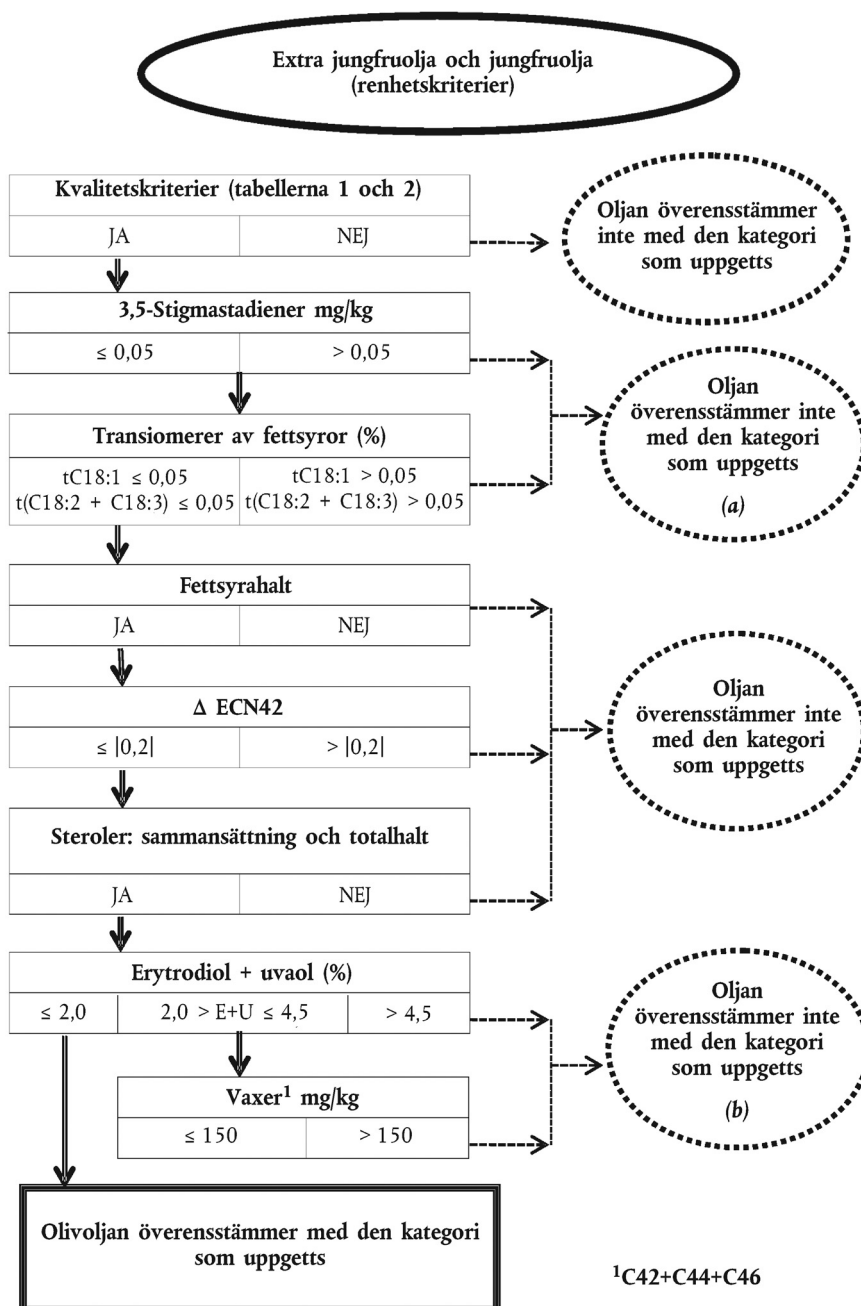
▼ M26

Tabell 2



▼ **M26**

Tabell 3



▼ **M26***Tillägg 1***Jämförelsetabell mellan bilagorna till denna förordning och de analyser som avses i beslutsschemat**

— Syrahalt	Bilaga II	Bestämning av fria fettsyror, metod vid låg temperatur
— Peroxidtal	Bilaga III	Bestämning av peroxidtalet
— UV-spektrofotometri	Bilaga IX	Spektrofotometrisk analys
— Organoleptisk bedömning	Bilaga XII	Organoleptisk bedömning av jungfruolja
— Etylestrar	Bilaga XX	Metod för bestämning av halten av vaxer, fettsyrametylestrar och fettsyraetylestrar med kapillärgaskromatografi
— 3,5-stigmastadiener	Bilaga XVII	Metod för bestämning av stigmastadiener i vegetabiliska oljor
▼ <b>M28</b>		
— Transisomerer av fettsyror	Bilaga X	Bestämning av fettsyrametylestrar med gaskromatografi
— Fettsyrahalt	Bilaga X	Bestämning av fettsyrametylestrar med gaskromatografi
▼ <b>M26</b>		
— ΔECN42	Bilaga XVIII	Bestämning av triglyceridsammansättningen i ECN 42 (skillnad mellan HPLC-data och teoretisk halt)
— Steroler: sammansättning och totalhalt	Bilaga V	Bestämning av sammansättningen och halten av steroler och triterpenialkoholer genom gaskromatografi med kapillärkolonn
— Erytrodiol och uvaol		
— Vaxer	Bilaga IV	Bestämning av vaxhalten genom gaskromatografi med kapillärkolonn
▼ <b>M28</b>		
— Alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer	Bilaga XIX	Bestämning av halten alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer med kapillärgaskromatografi
▼ <b>M26</b>		
— Mättade fettsyror i 2-ställning	Bilaga VII	Bestämning av procentandelen 2-glycerylmonopalmitat

▼ **M29***BILAGA II***BESTÄMNING AV FRIA FETTSYROR, METOD VID LÅG TEMPERATUR**

## 1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Metoden avser bestämning av fria fettsyror i olivolja och olivolja av pressrester. Halten av fria fettsyror uttrycks som procentandel oljesyra.

## 2. PRINCIP

Ett prov löses i en blandning av lösningsmedel och de närvarande fria fettsyror titreras med en lösning av kaliumhydroxid eller natriumhydroxid.

## 3. REAGENSER

Alla reagenser bör vara av analyskvalitet och det vatten som används ska vara destillerat eller ha motsvarande renhet.

## 3.1 Dietyleter: 95 % etanol (v/v), blandning av lika volymdelar.

Neutralisera exakt vid användningstillfället med kaliumhydroxidlösningen (3.2) med tillsats av 0,3 ml av fenolfaleinlösningen (3.3) per 100 ml blandning.

*Anmärkning 1:* Dietyleter är en mycket lättantändlig vätska och kan bilda explosiva peroxider. Särskild försiktighet bör iaktas vid användning.

*Anmärkning 2:* Om det inte är möjligt att använda dietyleter kan en blandning av lösningsmedel som innehåller etanol och toluen användas. Vid behov kan etanolen ersättas av propanol-2.

3.2 Kaliumhydroxid eller natriumhydroxid, titrerad etanol- eller vattenlösning,  $c(\text{KOH})$  [eller  $c(\text{NaOH})$ ] cirka 0,1 mol/l eller, vid behov,  $c(\text{KOH})$  [eller  $c(\text{NaOH})$ ] cirka 0,5 mol/l. Lösningar finns i handeln.

Den exakta koncentrationen av kaliumhydroxidlösning (eller natriumhydroxidlösning) ska vara känd och kontrolleras före användning. Använd en lösning som gjorts minst fem dagar före användning och dekanterats i en brun glasflaska med gummipropp. Lösningen bör vara färglös eller halmfärgad.

Om fassparation iaktas vid användning av vattenhaltig lösning av kaliumhydroxid eller natriumhydroxid ska vattenlösningen ersättas med en etanollösning.

*Anmärkning 3:* En stabil färglös lösning av kaliumhydroxid (eller natriumhydroxid) kan framställas på följande sätt: Koka upp 1 000 ml etanol eller vatten med 8 g kaliumhydroxid (eller natriumhydroxid) och 0,5 g aluminiumspån och fortsätt att koka under återflöde under 1 timme. Destillera lösningen omedelbart. Lös den behövliga mängden kaliumhydroxid (eller natriumhydroxid) i destillatet. Låt lösningen stå i flera dagar och dekantera supernatanten från fällningen av kaliumkarbonat (eller natriumkarbonat).

Lösningen kan också framställas utan destillation på följande sätt: Tillsätt 4 ml aluminiumbutylat till 1 000 ml etanol (eller vatten) och låt blandningen stå i flera dagar. Dekantera supernatanten och lös den behövliga mängden kaliumhydroxid (eller natriumhydroxid) i den. Lösningen är klar för användning.



**▼ M29**

3.3 Fenolftalein, 10 g/l lösning i 95–96 procentig etanol (v/v) eller alkaliskt blått 6B eller tymolftalein, 20 g/l lösning i 95–96 procentig etanol (v/v). Vid starkt färgade oljor ska alkaliskt blått eller tymolftalein användas.

## 4. UTRUSTNING

Vanlig laboratorieutrustning som innefattar:

4.1 Analysvåg

4.2 250 ml E-kolv

4.3 10 ml-byrett klass A, graderad i 0,05 ml, eller motsvarande automatisk byrett.

## 5. METOD

5.1 **Provberedning**

Om provet är grumligt ska det filtreras.

5.2 **Provmängd**

Ta ut ett prov beroende på den förväntade aciditeten i enlighet med följande tabell:

Förväntad aciditet: (oljesyra g/100g)	Provmassa (g)	Invägningssnoggrannhet (g)
0 till 2	10	0,02
> 2 till 7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Väg in provet i E-kolven (4.2).

5.3 **Bestämning**

Lös provet (5.2) i 50 till 100 ml av den neutraliserade blandningen av dietyleter och etanol (3.1).

Titra under omrörning med 0,1 mol/l lösning av kaliumhydroxid (eller natriumhydroxid) (3.2) (se anmärkning 4) tills indikatorn ändrar färg (färgindikatorns färg ska bestå under minst 10 sekunder).

*Anmärkning 4:* Om den nödvändiga mängden kaliumhydroxidlösning på 0,1 mol/l (eller natriumhydroxidlösning på 0,1 mol/l) överstiger 10 ml, använd en lösning på 0,5 mol/l eller ändra på provets massa utifrån den förväntade fria aciditeten och tabellen över förväntad aciditet.

*Anmärkning 5:* Om lösningen blir ogenomskinlig under titreringen, tillsätt tillräckligt med lösningsmedel (3.1) för att det ska bli en klar lösning.

Gör en andra bestämning om det första resultatet är högre än det angivna gränsvärdet för den aktuella oljekategorin.

**▼ M29**

## 6. RESULTATANGIVELSER

Aciditeten som massprocent av oljesyra motsvaras av följande:

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

där:

V = volymen kaliumhydroxid (eller natriumhydroxid) i ml som används vid titreringen,

c = den exakta koncentrationen i mol/l av den titrerade kaliumhydroxidlösnings (eller natriumhydroxidlösnings) som används,

M = 282 g/mol, dvs. molvikten i gram per mol oljesyra,

m = provets massa i gram.

Oljesyran ska anges enligt följande:

a) med två decimaler för värden från 0 till och med 1.

b) med en decimal för värden större än 1 till och med 100.

**▼B***BILAGA III***BESTÄMNING AV PEROXIDVÄRDET**

## 1. SYFTE

Denna standard beskriver en metod för bestämning av peroxidvärdet i oljor och fetter.

## 2. TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Denna standard är tillämplig på animaliska och vegetabiliska oljor och fetter.

## 3. DEFINITION

Peroxidvärdet är den kvantitet av de substanser i provet uttryckta i milliekvivalenter aktivt O<sub>2</sub>/kg som oxiderar kaliumjodid under de förhållanden som beskrivs.

## 4. PRINCIP

Behandling av provet i lösning i ättiksyra och kloroform med en lösning av kaliumjodid. Titrering av den frigjorda joden med ställd natriumtiosulfatlösning.

## 5. UTRUSTNING

All utrustning som skall användas skall vara fri från reducerande eller oxiderande ämnen.

*Anm:* Smörj inte slipade ytor.

## 5.1 3 ml glassked.

## 5.2 Kolvar med slipade halsar och proppar på ca 250 ml, torkade i förväg och fyllda med en torr, ren, inert gas (kväve eller företrädesvis koldioxid).

## 5.3 25 eller 50 ml byrett graderad i 0,1 ml.

## 6. REAGENSER

## 6.1 Kloroform, P. A. som befriats från syre genom att en ström av ren, torr inert gas bubblats igenom den.

## 6.2 Ättiksyra, P. A. befriad från syre genom att en ström av torr, ren gas bubblats igenom den.

## 6.3 Kaliumjodid, mättad vattenlösning, nyligen framställd, fri från jod och jodater.

## 6.4 Natriumtiosulfat 0,01 eller 0,002 N exakt ställd vattenlösning, ställd omedelbart före användning.

## 6.5 Stärkelselösning, 10 g per liter vattenlösning nyligen framställd av naturlig löslig stärkelse.

## 7. PROV

Se till att provet tas och bevaras kallt och mörkt i glasbehållare som skall vara helt fyllda, hermetiskt tillslutna med slipade glasproppar eller kork.

**▼B**

## 8. UTFÖRANDE

Analysen skall genomföras i diffust dagsljus eller artificiellt ljus. Väg in i ett väggglas (5.1) eller om inte detta går i en kolv (5.2) på 0,001 g när, en mängd av provet som överensstämmer medföljande tabell enligt det förväntade peroxidvärdet:

Förväntat peroxidvärde (mekv)	Provets vikt (g)
0 till 12	5,0 till 2,0
12 till 20	2,0 till 1,2
20 till 30	1,2 till 0,8
30 till 50	0,8 till 0,5
50 till 90	0,5 till 0,3

Ta bort proppen från en kolv (5.2) och för in väggglaset som innehåller provet. Tillsätt 10 ml kloroform (6.1). Lös provet snabbt under omrörning. Tillsätt 15 ml ättiksyra (6.2) och sedan 1 ml kaliumjodidlösning (6.3). Sätt snabbt i proppen, skaka om under en minut och låt stå i mörker exakt 5 minuter vid en temperatur mellan 15 och 25 °C.

Tillsätt ca 75 ml destillerat vatten. Titra den frigjorda joden med natriumtiosulfatlösning (6.4) (0,002 N lösning för förväntade värden som är mindre 12 och 0,01 N lösning för förväntade värden över 12) under omskakning och använd stärkelselösning (6.5) som indikator.

Genomför två bestämningar på samma prov.

Genomför samtidigt ett blindprov. Om resultatet av blindprovet överstiger 0,05 ml av 0,01 N natriumtiosulfatlösning (6.4) ersätt de orena reagenserna.

## 9. RESULTATANGIVELSE

Peroxidvärdet (PV), uttryckt som milliekvivalenter av aktivt O<sub>2</sub>/kg erhålls genom följande formel:

$$PV = \frac{V \times T \times 1000}{m}$$

där:

V = antalet ml av den ställda tiosulfatlösningen (6.4) som används i provet korrigerad för resultatet av blindprovet.

T = den exakta normaliteten hos natriumtiosulfatlösningen (6.4) som används.

m = vikten i gram av provet.

Som resultat tas det aritmetiska medelvärdet av de två bestämningarna som genomförts.

**▼ M21***BILAGA IV***BESTÄMNING AV VAXHALT MED KAPILLÄRGASKROMATOGRAFI**

## 1. SYFTE

Metoden avser bestämning av vaxhalten i olivolja. Vaxerna separeras efter antalet kolatomer. Metoden används särskilt för att skilja mellan olivolja som framställts genom pressning och olivolja som framställts genom extraktion.

## 2. PRINCIP

Oljan blandas med lämplig intern standard och fraktioneras sedan genom kromatografi på kiselgelkolonn. Den fraktion som först elueras under testförhållanden (och som har lägre polaritet än triglyceriderna) samlas upp och analyseras därefter direkt med hjälp av gaskromatografi på kapillärkolonn.

## 3. UTRUSTNING

## 3.1 E-kolv 25 ml.

## 3.2 Gaskromatografikolonn av glas, innerdiameter 15,0 mm, längd 30–40 cm, med kran.

## 3.3 Gaskromatograf som är anpassad till kapillärkolonn, utrustad med ett system för direktinjektion i kolonnen och bestående av följande:

## 3.3.1 Termostatstyrd, programmerbar kolonnugn.

## 3.3.2 ”On column” -injektor för direktinjektion i kolonnen.

## 3.3.3 En flamjonisationsdetektor och förstärkare.

## 3.3.4 Skrivare/integrator som är anpassad till förstärkaren (3.3.3), med responstid på högst 1 sekund och med variabel pappershastighet. (Det går också att använda datasystem för insamling av gaskromatografidata via PC.)

## 3.3.5 Kapillärkolonn av glas eller kvarts, längd 8–12 m, innerdiameter 0,25–0,32 mm, vars vätskefas har en filmtjocklek på 0,10–0,30 µm. (Vätskefas anpassad efter användning, av typen SE52 eller SE 54 som finns i handeln.)

## 3.4 Sprutor på 10 µl med härdad nål för direktinjektion i kolonnen.

## 3.5 Elektrisk vibrator.

## 3.6 Rotationsindunstare.

## 3.7 Muffelugn.

## 3.8 Analysvåg med en noggrannhet på + 0,1 mg.

## 3.9 Standarduppsättning av laboratorieglas.

## 4. REAGENS

## 4.1 Kiselgel med en kornstorlek på 60–200 µm.

Placera kiselgelen i ugnen vid 500 °C i minst fyra timmar. Efter kylning, tillsätt 2 % vatten till kiselgelen. Skaka ordentligt för att homogenisera blandningen. Förvara mörkt i minst 12 timmar före användning.

**▼ M21**

- 4.2 n-hexan för kromatografi.
- 4.3 Etyleter för kromatografi.
- 4.4 n-heptan för kromatografi.
- 4.5 Standardlösning av 0,1 % (m/V) laurylarakinat i hexan (intern standard). (Även palmitylpalmitat eller myristylstearat kan användas.)
- 4.5.1 *Sudan-1-(1-fenyl-azo-2-naftol)*
- 4.6 Bärigas: vätgas eller helium, ren, för gaskromatografi.
- 4.7 ”Make-up” -gas:

— ren vätgas för gaskromatografi.

— ren luft för gaskromatografi.

## 5. METOD

5.1 **Preparering av kromatografikolonnen**

Slamma upp 15 g kiselgel (4.1.) i n-hexan (4.2.) och håll det i kolonnen (3.2.). Låt kiselgelen sedimentera. Slutför sedimenteringen med hjälp av en elektrisk vibrator (3.5.) för att få den kromatografiska stationära fasen mer homogent packad. Skölj med 30 ml n-hexan för att avlägsna eventuella orenheter. Väg upp (3.8.) 500 mg av provet i en E-kolv på 25 ml (3.1.), tillsätt lämplig mängd intern standard (4.5.) beroende på uppskattad vaxhalt. Tillsätt 0,1 mg laurylarakinat för olivolja och 0,25–0,5 mg för olja av olivrestprodukter. Provet överförs sedan till kromatografikolonnen tillsammans med två portioner n-hexan (4.2) på 2 ml vardera.

Låt lösningen rinna till 1 mm ovanför adsorbentlagret, tillsätt sedan ytterligare 70 ml n-hexan för att eliminera de naturligt förekommande n-alkanerna. Börja sedan den kromatografiska elueringen genom att samla upp 180 ml av n-hexan/etyleterblandningen (99:1), med en hastighet på cirka 15 droppar/10 s. Elueringen av provet skall ske vid en temperatur på  $22 \pm 4$  °C.

*Anmärkning:* — Blandningen n-hexan/etyleter (99:1) skall beredas varje dag.

- För en visuell kontroll av att elueringen av vaxerna sker korrekt kan 100 µl sudan (1 %) tillsättas elueringsblandningen. Eftersom färgämnet har en retentionstid som ligger mellan den för vaxerna och triglyceriderna bör elueringen avslutas när färgningen nått botten av kolonnen, eftersom alla vaxer då har eluerats.

Torka den erhållna fraktionen i en rotationsindunstare (3.6.) tills nästan allt lösningsmedel försvunnit. Avlägsna de sista 2 ml av lösningsmedlet med hjälp av en svag kvävgasström, tillsätt sedan 2–4 ml n-heptan.

5.2 **Analys med gaskromatografi**5.2.1 *Förberedelser*

Montera kolonnen i gaskromatografen (3.3.) genom att ansluta inloppet till injektionssystemet och utloppet till detektorn. Kontrollera gaskromatografen (att gasanslutningarna är täta, detektorns och skrivarens effektivitet, etc.).

▼ **M21**

Om kolonnen används för första gången bör den först konditioneras. Låt en liten mängd gas strömma genom kolonnen och sätt sedan på gaskromatografen. Värm upp den gradvis under ca 4 timmar till en temperatur på 350 °C. Behåll denna temperatur i minst 2 timmar och ställ därefter in lämpliga analysparametrar (ställ in gasflödet, tänd flammans, anslut skrivaren/integratorn (3.3.4.), ställ in injektor-, kolonn- och detektortemperaturen). Se till att signalen har en känslighet som är minst två gånger högre än den nivå som krävs för att utföra analysen. Baslinjen skall vara rak och stabil, utan toppar.

Om baslinjen driver nedåt tyder det på att kolonnen inte är korrekt ansluten. Om den driver uppåt tyder det på att kolonnen inte har blivit ordentligt konditionerad.

5.2.2 *Val av analysparametrar*

Analysparametrarna väljs normalt enligt följande:

— kolonntemperatur:

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

— Detektortemperatur: 350 °C;

— Injicerad mängd: 1 µl lösning (2–4 ml) n-heptan

— Bärargas: helium eller vätgas med en linjär hastighet som är optimal för den gas som valts (se tillägget)

— Instrumentets känslighet: anpassad efter betingelserna nedan:

Beroende på kolonnens och gaskromatografens egenskaper kan betingelserna behöva ändras för att man skall få en separation av samtliga vaxer, en tillfredsställande upplösning av toppar (se figur) och en retentionstid för den interna standarden C<sub>32</sub> på 18 + 3 minuter. Vaxernas mest representativa topp skall motsvara minst 60 % av fullt skalutslag.

Bestäm parametrarna för integration av topparna på ett sådant sätt att en korrekt uppskattning av toppareorna erhålls.

*Anm.:* Med tanke på den höga sluttemperaturen tillåts en positiv drift på högst 10 % av fullt skalutslag.

5.3 **Analysförfarande**

Sug med hjälp av en 10 µl spruta upp 1 µl av lösningen. Dra tillbaka kolven tills nålen är tom. För in nålen i injektorn och injicera snabbt efter 1–2 sekunder. Efter cirka 5 sekunder dras nålen försiktigt ut.

Utför registreringens tills alla vaxer är helt eluerade.

**▼ M21**

Baslinjen måste alltid uppfylla de fastställda villkoren.

**5.4 Identifiering av toppar**

Identifiera topparna utifrån retentionstiderna genom att jämföra dem med blandningar av vaxer med kända retentionstider analyserade under samma betingelser.

Figuren visar ett kromatogram för vaxer av jungfruolja.

**5.5 Kvantitativ analys**

Bestäm toppareorna för den interna standarden och de alifatiska estrarna från C<sub>40</sub> till C<sub>46</sub> med hjälp av integratorn.

Beräkna vaxhalten i var och en av estrarna (uttryckt som mg/kg fettämne) med hjälp av följande formel:

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

där:

A<sub>x</sub> = topparean för varje ester, i kvadratmillimeter

A<sub>s</sub> = topparean för den interna standarden, i kvadratmillimeter

m<sub>s</sub> = mängden tillsatt intern standard, i milligram

m = den mängd av provet som tagits ut för analys, i gram.

**6. REDOVISNING AV RESULTAT**

Ange totalhalten av de olika vaxerna från C<sub>40</sub> till C<sub>46</sub>, i mg/kg fettämne (ppm).

*Anm.:* De komponenter som skall kvantifieras med hjälp av motsvarande toppar i kromatogrammet (se figur nedan) är estrar med ett jämnt antal kolatomer (C<sub>40</sub> till C<sub>46</sub>). Om estertoppen C<sub>46</sub> är svår att identifiera (dubbeltopp) bör man analysera vaxfraktionen för en olja av olivrestprodukter där C<sub>46</sub>-toppen är lättidentifierad eftersom den är klart störst.

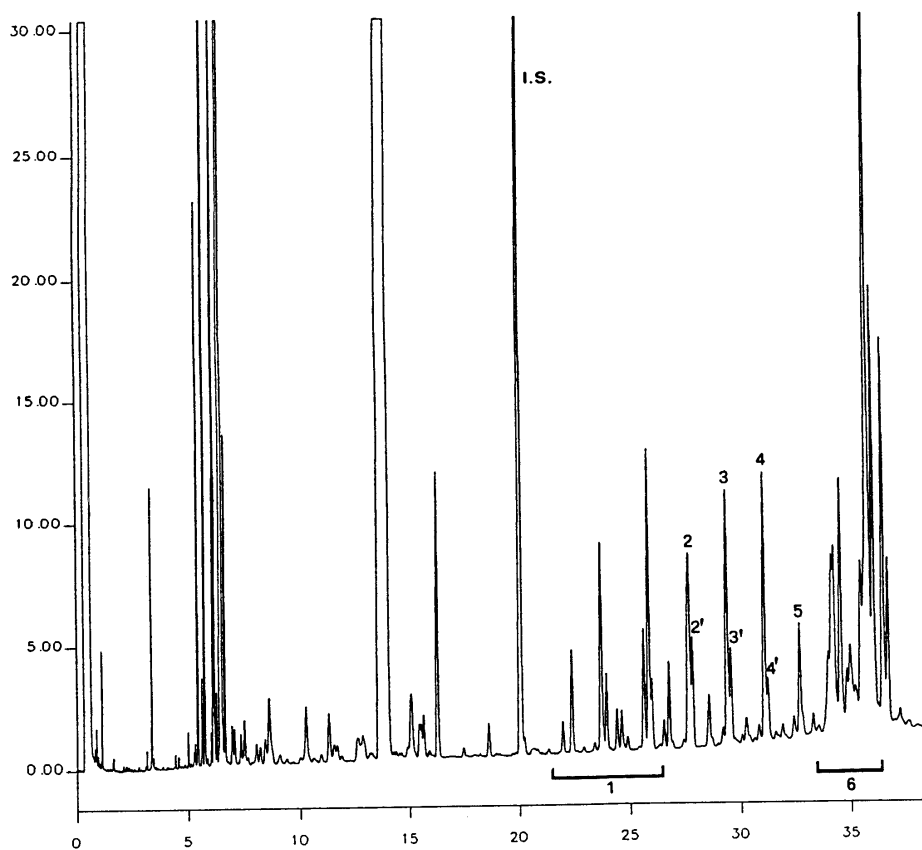
Resultaten uttrycks med en decimal.



## ▼ M21

Figur

## Kromatogram för vaxer i olivolja (1)



## Förklaringar:

- I.S. = Laurylarakinat  
 1. = Diterpenestrar  
 2 + 2' = C<sub>40</sub>-estrar  
 3 + 3' = C<sub>42</sub>-estrar  
 4 + 4' = C<sub>44</sub>-estrar  
 5. = C<sub>46</sub>-estrar  
 6. = Sterolestrar och triterpenestrar

(1) Efter eluering av sterolestrarna får kromatogrammet inte uppvisa några signifikanta toppar (triglycerider).

**▼ M21***Tillägg***Bestämning av gasens linjära hastighet**

Ställ in normala gängse analysparametrar och injicera därefter 1–3  $\mu\text{l}$  metan eller propan i gaskromatografen. Mät den tid det tar för gasen att gå igenom kolonnen, från det att den injiceras tills toppen passerat ( $t_M$ ).

Den linjära hastigheten i cm/sekund erhålls genom formeln  $L/t_M$  där  $L$  är kolonnens längd i cm och  $t_M$  är den uppmätta tiden i sekunder.

▼ **M26***BILAGA V***BESTÄMNING AV SAMMANSÄTTNINGEN OCH HALTEN AV STEROLER OCH TRITERPENDIALKOHOLER GENOM GASKROMATOGRAFI MED KAPILLÄRKOLONN**

1. SYFTE

Metoden avser bestämning av de enskilda och totala sterol- och triterpendialkoholhalterna hos olivolja och olivolja av pressrester.
2. PRINCIP

Olja med tillsats av  $\alpha$ -kolestanol som intern standard, förtvålbas med kaliumhydroxid i etanollösning och de oförtvålbara ämnena extraheras sedan med etyleter.

Sterol- och triterpendialkoholfraktionen separeras från de oförtvålbara ämnena genom tunnskikt-kromatografi på en basisk kiselgelplatta. De fraktioner som återvunnits från kiselgelen överförs till trimetylsilyletrar och analyseras genom gaskromatografi med kapillärkolonn.
3. UTRUSTNING

Sedvanlig laboratorieutrustning, i synnerhet följande:

  - 3.1. 250 ml kolv försedd med återflödeskylare med slipade anslutningsfogar.
  - 3.2. 500 ml separertratt.
  - 3.3. 250 ml kolvar.
  - 3.4. Kompletta apparatur för tunnskikt-kromatografi med 20 × 20 cm glasplattor.
  - 3.5. UV-lampa: 254 eller 366 nm.
  - 3.6. Mikrosprutor, 100 och 500  $\mu$ l.
  - 3.7. En cylindrisk filtertratt med poröst membran G 3 (porositet 15–40  $\mu$ m) och med en diameter på ca 2 cm, ett djup på 5 cm som passar för vakuumsfiltrering, med hanslipning.
  - 3.8. 50 ml vakuums-E-kolv med slipad glashals som kan användas för filtertratten (punkt 3.7).
  - 3.9. 10 ml provrör med konisk botten och glaspropp.
  - 3.10. Gaskromatograf lämpad för användning med kapillärkolonn med splitinjektion, bestående av
    - 3.10.1. termostatstyrd kolonnugn som kan hålla den önskade temperaturen med en noggrannhet av  $\pm 1^\circ\text{C}$ ,
    - 3.10.2. injektor med inställbar temperatur och försedd med ett förångnings-element av glas med silaniserad yta och splitsystem,
    - 3.10.3. Flamjoniseringsdetektor.
    - 3.10.4. System för datainsamling lämpligt för användning tillsammans med flamjoniseringsdetektorn (punkt 3.10.3.) som kan ställas in på manuell integration.
  - 3.11. Kapillärkolonn med kiseldioxid med en längd på 20 till 30 meter, innerdiameter 0,25 till 0,32 mm, belagd med 5 % difenyl - 95 % dimetylpolysiloxan (SE-52 eller SE-54 stationär fas eller motsvarande), med en enhetlig filmtjocklek mellan 0,10 och 0,30  $\mu$ m.

**▼ M26**

- 3.12. Mikrospruta på 10 µl, för gaskromatografi, med härdad nål lämplig för splitinjektion.
- 3.13. Exsickator med kalciumklorid.
4. REAGENS
- 4.1. Kaliumhydroxid, minst 85 %.
- 4.2. Kaliumhydroxid, circa 2 N, i etanol.  
Lös 130 g kaliumhydroxid (punkt 4.1) under kylning i 200 ml destillerat vatten och späd sedan till 1 liter med etanol (punkt 4.10). Förvara lösningen i väl tillslutna, mörka flaskor som lagras i högst två dagar.
- 4.3. Etyleter, av analyskvalitet.
- 4.4. Kaliumhydroxid, circa 0,2 N, i etanol.  
Lös 13 g kaliumhydroxid (punkt 4.1) i 20 ml destillerat vatten och späd till 1 liter med etanol (punkt 4.10).
- 4.5. Vattenfritt natriumsulfat, av analyskvalitet.
- 4.6. Glasplattor (20 × 20 cm) täckta med kiselgel utan flouresceinsindikator, tjocklek 0,25 mm (finns i handeln färdiga för användning).
- 4.7. Toluen, av kromatografisk kvalitet.
- 4.8. Aceton, av kromatografisk kvalitet.
- 4.9. n-Hexan, av kromatografisk kvalitet.
- 4.10. Etyleter, av kromatografisk kvalitet.
- 4.11. Etanol av analytisk kvalitet.
- 4.12. Etylacetat av analytisk kvalitet.
- 4.13. Referenslösning för tunnskiktscromatografi: kolesterol eller fytosterol, och Erytrodiol 5 % lösning i etylacetat (punkt 4.11).
- 4.14. 2,7-diklorflourecein, 0,2 %, i etanollösning. Denna görs lätt basisk genom att tillsätta ett par droppar 2 N alkoholisk kaliumhydroxidlösning (punkt 4.2).
- 4.15. Vattenfri pyridin, av kromatografisk kvalitet (se Anmärkning 5).
- 4.16. Hexametyldisilasan av analyskvalitet.
- 4.17. Trimetylklorosilan av analyskvalitet.
- 4.18. Provlösningar av steroltrimetylsilyletrar.  
Bereds omedelbart före användning av steroler och erytrodiol som erhållits från oljor som innehåller dem.
- 4.19.  $\alpha$ -Kolestanol, renhet över 99 % (renheten måste kontrolleras genom analys med gaskromatografi)
- 4.20.  $\alpha$ -kolestanol som intern standard, 0,2 % lösning (m/V) i etylacetat (punkt 4.11).
- 4.21. Fenoltaleinlösning, 10 g/l i etanol (punkt 4.10).
- 4.22. Bargas: väte eller helium, av gaskromatografisk kvalitet.
- 4.23. Hjälpgasar: väte, helium, kväve och luft, av gaskromatografisk kvalitet.

**▼ M26**

- 4.24. n-Hexan (punkt 4.9)/etyleter (punkt 4.10): blandning 65:35 (V/V).
- 4.25. Silyleringsreagens, bestående av en blandning 9:3:1 (V/V/V) av pyridin/hexametyldisilasan/trimetylklorosilan.

**5. UTFÖRANDE****5.1. Beredning av oförtvålbare ämnen**

- 5.1.1. Med hjälp av en 500 µl mikrospruta (punkt 3.6) införs i 250 ml kolven (punkt 3.1) en volym  $\alpha$ -kolestanol som intern standard (punkt 4.20) innehållande en mängd kolestanol motsvarande ca 10 % av sterolhalten i provet. Exempelvis tillsätts 500 µl  $\alpha$ -kolestanollösning (punkt 4.20) per 5 g prov när det gäller olivolja och 1 500 µl för olivolja av pressrester. Indunsta till torrhet under en försiktig ström av kväve i ett varmt vattenbad. Kyl kolven. Väg upp  $5 \pm 0,01$  g torrt filtrerat prov i kolven.

*Anmärkning 1:* Animaliska eller vegetabiliska oljor och fetter som innehåller betydande kvantiteter av kolesterol kan visa en topp med en retentionstid som är nära den för kolestanol. Om detta inträffar måste sterolfractionen analyseras dubbelt med och utan intern standard.

- 5.1.2. Tillsätt 50 ml 2 N kaliumhydroxid i etanollösning (punkt 4.2) och lite pimpsten. Sätt på återflödeskylaren och värm till svag kokning tills förtvålning inträder (lösningen blir klar). Fortsätt upphettningen under ytterligare 20 minuter, och tillsätt sedan 50 ml destillerat vatten från toppen av återflödeskylaren. Ta bort kylaren och kyl kolven till ca 30 °C.

- 5.1.3. Överför kolvens innehåll kvantitativt till en 500 ml separertratt (punkt 3.2) genom att använda flera portioner destillerat vatten (50 ml). Tillsätt cirka 80 ml etyleter (punkt 4.10). Skaka omsorgsfullt i ungefär 60 sekunder och frigör regelbundet trycket genom att vända upp och ned på separertratten och öppna avstängningsventilen. Låt stå tills de två faserna har separerats fullständigt (Anmärkning 2).

Överför därefter tvällösningen så fullständigt som möjligt i en annan separertratt. Genomför ytterligare två extraheringar av vatten-alkoholfasen på samma sätt med användande av 60–70 ml etyleter (punkt 4.10).

*Anmärkning 2:* Eventuell emulsion kan förstöras genom tillsats av små kvantiteter etanol (punkt 4.11).

- 5.1.4. Samla de tre eterextrakten i en separertratt som innehåller 50 ml vatten. Fortsätt att tvätta med vatten (50 ml) till dess att tvättvattnet inte längre ger en rosa färg vid tillsättning av en droppe fenolftaleinlösning (punkt 4.21).

När tvättvattnet har avlägsnats, filtrera på vattenfritt natirumsulfat (punkt 4.5) ner i en i förväg vägd 250 ml kolv, och tvätta därefter tratten och filtret med små mängder etyleter (punkt 4.10).

- 5.1.5. Låt lösningsmedlet avdunsta genom destillation i rotationsindunstare vid 30 °C under vakuum. Tillsätt 5 ml acetone och avlägsna det flyktiga lösningsmedlet helt i en svag luftström. Torka återstoden i torkskåp vid  $103 \pm 2$  °C i 15 minuter. Kyl i exsickator och väg med 0,1 mg noggrannhet.

**▼ M26**

- 5.2. Separation av sterol- och triterpentialkoholfraktionen (erytrodiol + uvaol)
- 5.2.1. Beredning av de basiska plattorna för tunnskiktskromatografi. Sänk ner kiselgelplattorna (punkt 4.6) cirka 4 cm i 0,2 N kaliumhydroxidetanollösning (punkt 4.5) i 10 sekunder och låt sedan torka i dragskåp i två timmar varefter de placeras i ett torkskåp vid 100 °C i en timme.

Ta ut plattorna från torkskåpet och förvara dem i en exsickator (punkt 3.13) med kalciumklorid tills de ska användas (plattor som behandlas på detta sätt måste användas inom 15 dagar).

*Anmärkning 3:* Om kiselplattor används för att separera sterolfraktionen behöver inte de oförtvålbare fraktionerna behandlas med aluminiumoxid. På det här sättet kan alla sura föreningar (fettsyror och andra) behållas på identifieringslinjen och sterolbandet separeras klart från de alifatiska alkoholernas och triterpenalkoholernas band.

- 5.2.2. Fyll på n-hexan/etyleterblandningen (punkt 4.24) (Anmärkning 4) i framkallningskammaren till ett djup av cirka 1 cm. Stäng kammaren med tillhörande lock och låt stå svalt ca en halvtimme så att jämnvikten vätska/gas inställer sig. Remsor av filterpapper som doppas ner i eluenten kan placeras på insidorna av kammaren. Detta minskar framkallningstiden med ca en tredjedel och åstadkommer en jämnare eluering av komponenterna.

*Anmärkning 4:* Framkallningsblandningen ska bytas för varje test för att få exakt reproducerbara elueringsförhållanden. En blandning av 50:50 (V/V) av n-hexan/etyleter kan också användas.

- 5.2.3. Förbered en cirka 5 % lösning av de oförtvålbare ämnena (punkt 5.1.5) i etylacetat (punkt 4.12) och stryk ut med 100 µl mikrosprutan 0,3 ml av lösningen smalt och jämnt på den nedre delen (2 cm) av kromatografiplattan. Placera i linje med strykningen 2 till 3 µl av referenslösningen (4.13) så att sterol- och triterpentialkoholbandet kan identifieras efter framkallning.

- 5.2.4. Placera plattan i framkallningskammaren som iordningställt enligt punkt 5.2.2. Rumstemperaturen ska hållas mellan 15 och 20 °C (Anmärkning 5). Stäng kammaren omedelbart med locket och påbörja elueringen tills lösningsmedlets främre kant når till ca 1 cm från övre änden av plattan. Ta ut plattan ur framkallningskammaren och låt lösningsmedlet avdunsta i en ström av varmluft eller genom att plattan får ligga en kort stund i dragskåp.

*Anmärkning 5:* Högre temperatur kan försämra separationen.

- 5.2.5. Spraya plattan lätt och jämnt med 2,7-diklorfluoreceinlösningen (punkt 4.14) och låt torka. När plattan betraktas i ultraviolett ljus kan sterol- och triterpentialkoholbanden identifieras genom att de ligger i höjd med fläckarna som erhållits från referenslösningen (punkt 4.13). Markera änden av banden längs kanterna av flouoscensen med svart blyerts (se TLC-platta, figur 3).

- 5.2.6. Skrapa med hjälp av en metallspatel bort kiselgelen från det markerade området. Placera det finfördelade materialet som tagits bort i filtrertratten (punkt 3.7). Tillsätt 10 ml het etylacetat (punkt 4.12), blanda omsorgsfullt med metallspateln under vakuum och filtrera i E-kolven (punkt 3.8) som är ansluten till filtrertratten.

▼ **M26**

Tvätta återstoden i kolven tre gånger med etyleter (punkt 4.3) (circa 10 ml varje gång) och samla upp filtratet i samma kolv som är ansluten till filtertratten. Indunsta filtratet till en volym på 4–5 ml och överför resterande lösning till det tidigare vägda 10 ml provröret (punkt 3.9), låt indunsta fullständigt under lätt uppvärmning, i svagt kväveflöde, fyll på nytt genom att använda några droppar aceton (punkt 4.8) och indunsta till torrhet.

Återstoden i provröret består av sterol- och triterpendialkoholfractionerna.

## 5.3. Preparering av trimetylsilyletrarna

## 5.3.1. Tillsatt silyleringsreagensen (punkt 4.25) (Anmärkning 6), i förhållandet 50 µl för varje mg steroler och triterpendialkoholer, i provröret som innehåller sterol- och triterpenfraktionen. Undvik upptag av fuktighet (Anmärkning 7).

*Anmärkning 6:* Lösningar som är klara för användning finns i handeln. Andra silyleringsreagensen, såsom bistrimethylsilyltri-fluoracetamid + 1 % trimetylklorosilan, som måste spädas med lika stor volym vattenfri pyridin finns också i handeln.

Pyridinet kan ersättas med samma mängd acetonitril.

## 5.3.2. Sätt proppen i provröret, skaka försiktigt (utan att vända på det) tills föreningarna är helt lösta. Låt stå i minst 15 minuter i rumstemperatur och centrifugera sedan i ett par minuter. Den klara lösningen är nu färdig för analys med gaskromatografi.

*Anmärkning 7:* Eventuell bildning av en svag opalescens är normal och inverkar inte. Bildandet av en vit flockning eller rosafärgning är tecken på närvaro av fukt och sönderfall hos reagensen. Om detta inträffar ska testet upprepas (endast om hexametyldisilazan/trimetylklorosilan används).

## 5.4. Analys med gaskromatografi

## 5.4.1. Förberedelser, iordningställande av kapillärkolonn.

## 5.4.1.1. Montera kolonnen (punkt 3.11) i gaskromatografen genom att kolonnens inlopp ansluts till splitinjektorn och kolonnens utlopp till detektorn.

En allmän kontroll av gaskromatografen genomförs (gasanslutningarna ska vara täta, detektorn i fullgott skick, splitsystem och registrerings-system fungerande etc).

## 5.4.1.2. Om kolonnen används för första gången rekommenderas det att den först prepareras: En liten mängd gas får flyta genom kolonnen och sedan kopplas gaskromatografen på och en gradvis upphettning genomförs tills temperaturen är minst 20 °C över drifttemperaturen (Anmärkning 8). Denna temperatur bibehålls i minst två timmar och sedan ställs kromatografen iordning för driftförhållanden (inställning av gasflöde och splitning, tändning av flammen, anslutning till databehandlingssystemet, inställning av temperaturen i kolonnen, detektorn och injektorn), och registrera signalen med en känslighet som är minst två gånger högre än den som beräknas för analysen. Baslinjen ska vara linjär, utan några toppar av något slag, och får inte visa tecken på drift.

▼ **M26**

Negativ rak drift av linjen är tecken på otäta kolonnanslutningar, medan en positivt drift tyder på otillräcklig preparering av kolonnen.

*Anmärkning 8:* Temperaturen vid prepareringen ska vara minst 20 °C lägre än den maximitemperatur som specificeras för den stationära fas som används.

## 5.4.2. 5.4.2 Val av analysparametrar.

## 5.4.2.1. Analysparametrarna väljs enligt följande:

- Kolonntemperatur:  $260 \pm 5$  °C.
- Injektortemperatur: 280–300 °C.
- Detektortemperatur: 280–300 °C.
- Linjär hastighet för bärgasen: helium 20–35 cm/s, väte 30–50 cm/s.
- Splitförhållande 1:50–1:100.
- Instrumentets känslighet: 4–16 gånger högre än minimikänsligheten.
- Registreringskänslighet: 1–2 mV fullt skalutslag.
- Kvantitet av det injicerade ämnet: 0,5–1 µl TMSE-lösning.

Dessa parametrar kan ändras beroende på egenskaperna hos kolonnen och gaskromatografen för att få kromatogram som uppfyller följande krav:

- Retentionstiden för β-sitosteroltoppen bör vara  $20 \pm 5$  minuter.
- Kampesteroltoppen bör vara följande: för olivolja (medelhalt 3 %)  $20 \pm 5$  % av fullt utslag, för sojaolja (medelhalt 20 %)  $80 \pm 10$  % av fullt utslag.
- Alla närvarande steroler måste separeras. Förutom att separeras måste alla toppar vara helt och hållet synliga, dvs varje toppkurva ska återvända till baslinjen innan nästa topp ritas. Ofullständig upplösning kan emellertid tolereras under förutsättning att toppen vid RRT 1,02 (sitostanol) kan kvantifieras med hjälp av topphöjden.

## 5.4.3. Analysförfarande

## 5.4.3.1. Sug med hjälp av en 10 µl mikrospruta upp 1 µl hexan, sug in 0,5 µl luft och sedan 0,5–1 µl av provlösningen. Dra ut kolven ur sprutan ytterligare så att kanylen töms. Stick in kanylen genom membranet i injektorn och spruta snabbt efter en till två sekunder in innehållet och drag sedan sakta ut kanylen efter ca fem sekunder.

En automatisk injektor kan även användas.

## 5.4.3.2. Genomför registreringen tills de närvarande triterpentialkoholernas TMSE har eluerats fullständigt. Baslinjen måste fortsätta att uppfylla kraven (punkt 5.4.1.2).

## 5.4.4. Identifiering av toppar

Identifiera individuella toppar på grundval av retentionstiderna och genom jämförelse med blandningen av sterol- och triterpentialkohol-TMSE, som analyseras med samma parametrar (se tillägget).



**▼ M26**

Sterolerna och triterpentialkoholerna elueras i följande ordning: kolesterol, brassikasterol, ergosterol, 24-metylenkolesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol,  $\Delta 7$ -kampesterol,  $\Delta 5,23$ -stigmastadienol, klerosterol,  $\beta$ -sistosterol, sitostanol,  $\Delta 5$ -avenasterol,  $\Delta 5,24$ -stigmastadienol,  $\Delta 7$ -stigmastenol,  $\Delta 7$ -avenasterol, erytrodiol och uvaol.

Retentionstiderna för sitosterol för SE-52- och SE-54-kolonner framgår av tabell 1.

Figurerna 1 och 2 visar typiska kromatogram för en del oljor.

## 5.4.5. Kvantitativ utvärdering

5.4.5.1. Beräkna areorna för  $\alpha$ -kolestanol- och sterol- och triterpentialkoholtopparna med hjälp av databehandlingssystemet. Bortse från toppar för föreningar som inte finns med (ergosterol ska inte beräknas) bland de som är upptagna i tabell 1. Responsen för  $\alpha$ -kolestanol ska vara lika med 1.

5.4.5.2. Beräkna koncentrationen för varje sterol i mg/100 g fett enligt följande:

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

där

$A_x$  = arean av sterol x, enligt beräkning av databehandlingssystemet

$A_s$  = arean av toppen för  $\alpha$ -kolestanol, enligt beräkning av databehandlingssystemet

$m_s$  = massan av tillsatt  $\alpha$ -kolestanol i milligram

$m$  = massan av det prov som använts för bestämningen, i gram.

## 6. RESULTAT

6.1. Ange de enskilda sterolkoncentrationerna i milligram per 100 g fett och summan av dem som "summan av sterolerna".

Sammansättningen av var och en av de enskilda sterolerna och av erytrodiol och uvaol bör uttryckas med en decimals noggrannhet.

Sammansättningen av summan av sterolerna ska anges utan decimal.

**▼ M28**

6.2. Beräkna procentandelen av varje enskild sterol som förhållandet mellan den aktuella topparean och den totala topparean för steroler:

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

där

$A_x$  = topparea för x,

$\sum A$  = total topparea för steroler.

**▼ M26**

6.3. Apparent  $\beta$ -sitosterol:  $\Delta 5,23$ -stigmastadienol + klerosterol +  $\beta$ -sitosterol + sitostanol +  $\Delta 5$ -avenasterol +  $\Delta 5,24$ -stigmastadienol.

**▼ M26**

- 6.4. Beräkna den procentuella andelen erythrodiol och uvaol:

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

där

$\Sigma\text{A}$  = summan av areorna för sterol enligt beräkning av databehandlingssystemet

Er = arean för erythrodiol enligt beräkning av databehandlingssystemet

Uv = arean för uvaol enligt beräkning av databehandlingssystemet

▼ **M26***Tillägg***Bestämning av den linjära hastigheten hos gasen**

Spruta in 1–3 µl metan (eller propan) i gaskromatografen under vanliga analysparametrar och mät den tid det tar för gasen att passera kolonnen från insprutningsögonblicket till den tidpunkt då toppen framträder (tM).

Den linjära hastigheten i cm/s erhålls genom L/tM där L är kolonnens längd i cm och tM är den uppmätta tiden i sekunder.

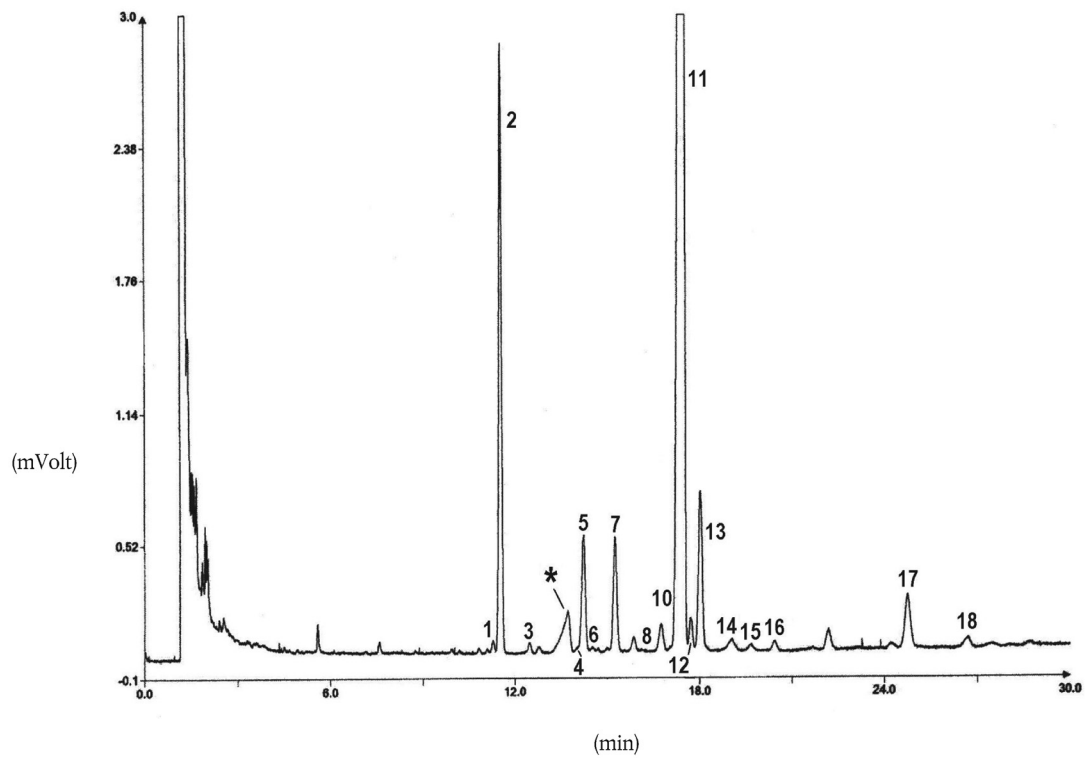
*Tabell 1***Relativa retentionstiden för steroler**

Topp	Identifiering		Relativ retentionstid	
			SE 54 kolumn	SE 52 kolumn
1	Kolesterol	$\Delta$ -5-kolesten-3 $\beta$ -ol	0,67	0,63
2	Kolestanol	5 $\alpha$ -kolestan-3 $\beta$ -ol	0,68	0,64
3	Brassikasterol	[24S]-24-metyl- $\Delta$ -5,22-kolestadien-3 $\beta$ -ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S] 24 metyl $\Delta$ 5-7-22 kolestatrien 3 $\beta$ -ol	0,78	0,76
4	24-metylenkolesterol	24-metylen- $\Delta$ -5,24-kolestadien-3 $\beta$ -ol	0,82	0,80
5	Kampesterol	[24R]-24-metyl- $\Delta$ -5-kolesten-3 $\beta$ -ol	0,83	0,81
6	Kampestanol	[24R]-24-metylkolestan-3 $\beta$ -ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	[24S]-24-etyl- $\Delta$ -5,22-kolestadien-3 $\beta$ -ol	0,88	0,87
8	$\Delta$ -7-kampesterol	[24R]-24-metyl- $\Delta$ -7-kolesten-3 $\beta$ -ol	0,93	0,92
9	$\Delta$ -5,23-stigmastadienol	[24R,S]-24-etyl- $\Delta$ -5,23-kolestadien-3 $\beta$ -ol	0,95	0,95
10	Klerosterol	[24S]-24-etyl- $\Delta$ -5,25-kolestadien-3 $\beta$ -ol	0,96	0,96
11	$\beta$ -sitosterol	[24R]-24-etyl- $\Delta$ -5-kolesten-3 $\beta$ -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etyl-kolestan-3 $\beta$ -ol	1,02	1,02
13	$\Delta$ -5-avenasterol	[24Z]-24-etylid- $\Delta$ -5-kolesten-3 $\beta$ -ol	1,03	1,03
14	$\Delta$ -5-24-stigmastadienol	[24R,S]-24-etyl- $\Delta$ -5,24-kolestadien-3 $\beta$ -ol	1,08	1,08
15	$\Delta$ -7-stigmastenol	[24R,S]-24-etyl- $\Delta$ -7-kolesten-3 $\beta$ -ol	1,12	1,12
16	$\Delta$ -7-avenasterol	[24Z]-24-etylid- $\Delta$ -7-kolesten-3 $\beta$ -ol	1,16	1,16
17	Erytrodiol	5 $\alpha$ olean-12en-3 $\beta$ 28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	$\Delta$ 12-ursen-3 $\beta$ 28-diol	1,52	1,52

▼ M26

Figur 1

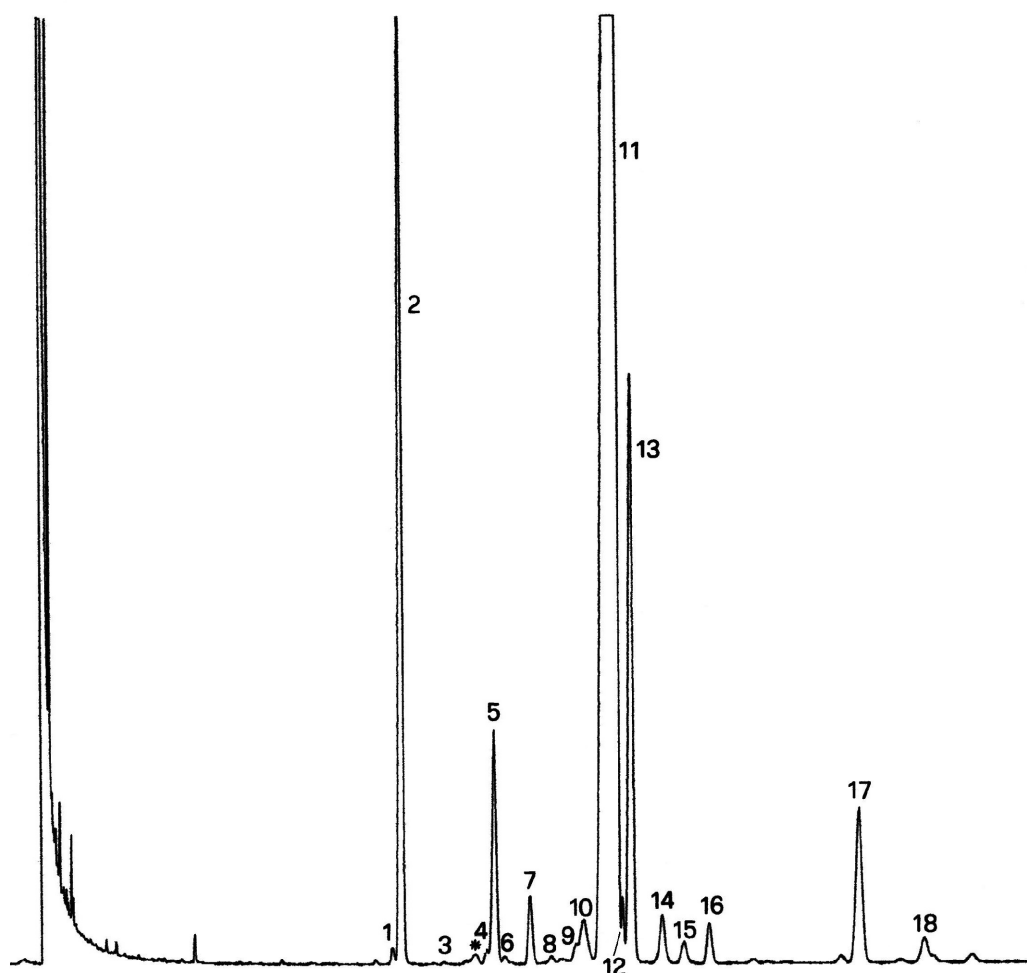
Gaskromatogram för sterol- och triterpentialkoholfraktionen av raffinerad olivolja (som tillsatts intern standard)



▼ M26

Figur 2

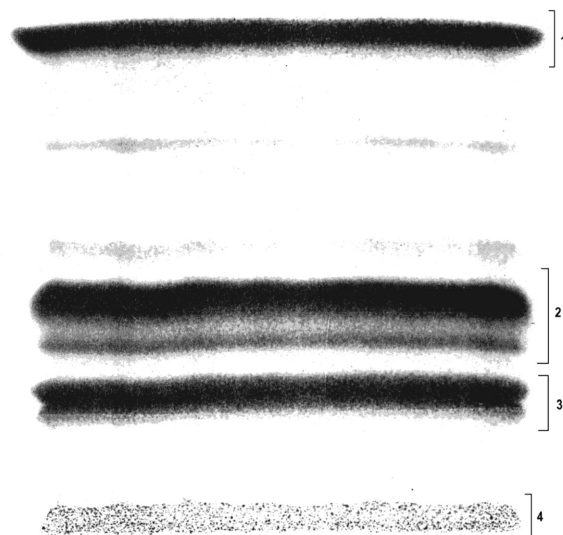
Gaskromatogram för sterol- och triterpentialkoholfraktionen av en bomolja (som tillsatts intern standard)



▼ M26

Figur 3

TLC-platta av olivolja av pressrester med det område som måste skrapas för att bestämma förekomsten av steroler och triterpendialkoholer



- 1 – Skvalen
- 2 – Triterpenalkoholer och alifatiska alkoholer
- 3 – Steroler och triterpendialkoholer
- 4 – ???Start??? och fria fettsyror

---

**▼ M21***BILAGA VII***BESTÄMNING AV PROCENTANDELEN 2-GLYCERYLMONOPALMITAT****1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE**

Metoden avser bestämning av procentandelen palmitinsyra i 2-ställning för triglycerider genom bestämning av 2-glycerylmonopalmitat.

Metoden kan tillämpas på flytande vegetabiliska oljor vid en temperatur på 20 °C.

**2. PRINCIP**

Efter beredning av oljeprovet tillsätts pankreaslipas. Detta leder till partiell och specifik hydrolys i 1- och 3-ställning för triglyceridmolekylen varigenom monoglycerider i 2-ställning uppkommer. Procentandelen 2-glycerylmonopalmitat i monoglyceridfraktionen bestäms, efter silyle-ring, med kapillärgaskromatografi.

**3. UTRUSTNING**

3.1 E-kolv 25 ml

3.2 Glasbägare, 100, 250 och 300 ml

3.3 Kromatografikolonn av glas, innerdiameter 21–23 mm, längd 400 mm, med porös glasskiva och kran

3.4 Graderade provrör 10, 50, 100 och 200 ml

3.5 Kolvar 100 och 250 ml

3.6 Rotationsindunstare

3.7 Centrifugrör 10 ml, med konformad botten och slipad propp

3.8 Centrifug för rör 10 och 100 ml

3.9 Termostat som håller temperaturen på 40 + 0,5 °C

3.10 Mätpipetter, 1 och 2 ml

3.11 Injektionsspruta 1 ml

3.12 Spruta 100 µl

3.13 Tratt, 1 000 ml

3.14 Kapillärgaskromatograf med ”on column” -injektor för direktinjektion av provet i kolonnen och en ugn som kan hålla vald temperatur med en noggrannhet på + 1 °C

3.15 ”On column” -injektor för direktinjektion av provet i kolonnen

3.16 En flamjonisationsdetektor och elektrometer

3.17 Skrivare/integrator som är anpassad till elektrometern, med responstid på högst 1 sekund och med variabel pappershastighet

3.18 Kapillärkolonn av glas eller kvarts, längd 8–12 meter, innerdiameter 0,25–0,32 mm, belagd med 5-procentig metylpolysiloxan eller fenylmetylpolysiloxan (tjocklek 0,10–0,30 µm) som kan användas vid 370 °C

**▼ M21**

- 3.19 Spruta 10 µl med härdad nål, minst 7,5 cm, för direktinjektion i kolonnen
4. REAGENS
- 4.1 Kiselgel med en kornstorlek på 0,063–0,200 mm (70/280 mesh), beredd enligt följande: placera kiselgelen i en porslinskapsel, torka i ugnen vid 160 °C i 4 timmar, låt svalna i exsickator. Tillsätt en mängd vatten som motsvarar 5 % av kiselgelens vikt, enligt följande: mät upp 152 g kiselgel i en E-kolv på 500 ml och tillsätt 8 g destillerat vatten, sätt på proppen och skaka lätt så att vattnet blir jämnt fördelat. Låt stå i minst 12 timmar före användning.
- 4.2 n-hexan för kromatografi
- 4.3 Isopropanol
- 4.4 Isopropanol, vattenlösning 1:1 (v/v)
- 4.5 Pankreaslipas. Lipaset skall ha en aktivitet på 2,0–10 lipasenheter/mg (i handeln finns det pankreaslipas med en aktivitet på 2–10 enheter per mg enzym).
- 4.6 Buffertlösning av tris(hydroximetyl)aminometan: vattenlösning 1 M där pH justeras till 8 (kontrolleras med potentiometer) genom tillsats av koncentrerad HCl (1:1 v/v)
- 4.7 Natriumkodat, enzymkvalitet, 1-procentig vattenlösning (lösningen bör användas inom 15 dagar efter det att den beretts)
- 4.8 Kalciumklorid, 22-procentig vattenlösning
- 4.9 Dietyleter för kromatografi
- 4.10 Elueringsmedel: blandning n-hexan/dietyleter (87:13) (v/v)
- 4.11 Natriumhydroxid, lösning på 12 viktprocent
- 4.12 Fenoltalein, 1-procentig lösning i etanol
- 4.13 Bärgas: vätgas eller helium, för gaskromatografi
- 4.14 ”Make-up” -gas: vätgas, minst 99 %, fri från fukt och organiska ämnen – och luft för gaskromatografi, av samma renhetsgrad
- 4.15 Silyleringsreagens: blandning pyridin/hexametyldisilazan, trimetylklorosilan 9:3:1 (v/v/v). (Det finns färdiga lösningar i handeln. Andra silyleringsreagenser kan användas, t.ex. bis-trimetylsilyltrifluoracetamid + 1 % trimetylklorosilan, utspätt med lika mängd vattenfritt pyridin.)
- 4.16 Referensprover: rena monoglycerider eller blandningar av monoglycerider med en liknande procentuell sammansättning som provet
5. FÖRFARANDE
- 5.1 **Provbredning**
- 5.1.1 Oljor med en halt av fria syror lägre än 3 % behöver inte neutraliseras före kromatografi på kolonn med kiselgel. Oljor med en halt av fria syror över 3 % skall neutraliseras i enlighet med punkt 5.1.1.1.



**▼ M21**

- 5.1.1.1 Häll 50 g olja och 200 ml n-hexan i en tratt på 1 000 ml (3.13). Tillsätt 100 ml isopropanol och en mängd 1-procentig natriumhydroxidlösning (4.11) som motsvarar oljans fria syrahalt ökat med 5 %. Skaka kraftigt i 1 minut. Tillsätt 100 ml destillerat vatten, skaka igen och låt stå.

Efter dekantering, avlägsna det nedre skiktet som innehåller tvål. Avlägsna eventuella mellanliggande skikt (slem och olösliga ämnen). Tvätta den neutraliserade hexanlösningen av oljan flera gånger med 50–60 ml lösning av isopropanol och vatten 1:1 (v/v) (4.4) till dess den rosafärgade tonen på fenoltaleinet försvunnit.

Avlägsna det mesta av hexanet genom vakuumdestillation (t.ex. med en rotationsindunstare) och för över oljan till en kolv på 100 ml (3.5). Torka oljan i vakuum till dess att lösningsmedlet har försvunnit helt.

När så skett bör oljans syrahalt ligga under 0,5 %.

- 5.1.2 Häll 1,0 g olja som beretts enligt ovan i en 25 ml E-kolv (3.1) och lös upp i 10 ml lösningsmedel (4.10). Låt lösningen stå i minst 15 minuter före kromatografi på kolonn med kiselgel.

Om lösningen är grumlig, centrifugera den för att uppnå optimala förhållanden för kromatografi. (Till detta används t.ex. SPE-kolonner på 500 g med kiselgel, färdiga för användning).

- 5.1.3 *Preparering av kromatografikolonnen*

Häll i ca 30 ml lösningsmedel (4.10) i kolonnen (3.3), placera en bomullstuss i den nedre delen av kolonnen med hjälp av en glasstav och pressa ut luften.

Slamma upp 25 g kiselgel (4.1) i ca 80 ml lösningsmedel i en glasbägare och häll i den i kolonnen med hjälp av en tratt.

Kontrollera att all kiselgel har hamnat i kolonnen. Tvätta med lösningsmedlet (4.10), öppna kranen och låt vätskenivån sjunka till ca 2 mm ovanför kiselgelens övre nivå.

- 5.1.4 *Kromatografi*

Väg upp exakt 1,0 g av provet som beretts enligt punkt 5.1 i en E-kolv på 25 ml (3.1).

Lös upp provet i 10 ml elueringsmedel (4.10). Häll lösningen i kromatografikolonnen som förberetts enligt punkt 5.1.3. Rubba inte kolonnytan.

Öppna kranen och fyll på med provlösning upp till kiselgelen. Eluera med 150 ml elueringsmedel. Ställ in flödes hastigheten på 2 ml/min (så att 150 ml rinner igenom kolonnen på ca 60–70 minuter).

Samla upp eluatet i en 250 ml rundkolv som tarerats i förväg. Förånga lösningsmedlet i vakuum och avlägsna lösningsmedelsresterna med en ström av kvävgas.

Väg kolven och beräkna mängden extrakt som erhållits.

**▼ M21**

(Vid användning av SPE-kolonn med kiselgel som är färdig för användning, förfar enligt följande: Fyll på 1 ml lösning (5.1.2.) i kolonnerna, som dessförinnan förberetts med 3 ml n-hexan.

När lösningen passerat genom kolonnen, eluera med 4 ml n-hexan/-dietyleter 9:1 (v/v).

Samla upp eluatet i ett 10 ml rör och förånga med en ström av kvävgas tills all vätska försvunnit.

Tillsätt pankreaslipas till torrsubstansen (5.2.). Det är absolut nödvändigt att kontrollera fettsyresammansättningen både före och efter passagen genom SPE-kolonnen).

**5.2 Hydrolys med pankreaslipas**

5.2.1 Väg upp 0,1 g olja som beretts enligt punkt 5.1. i centrifugröret. Tillsätt 2 ml buffertlösning (4.6.), 0,5 ml natriumkollatlösning (4.7.) och 0,2 ml kalciumkloridlösning och skaka väl efter varje tillsats. Förslut röret med den slipade proppen och placera det i termostaten vid en temperatur på  $40 \pm 0,5$  °C.

5.2.2 Tillsätt 20 mg lipas, blanda väl (undvik att blöta ner proppen) och placera röret i termostaten under exakt 2 minuter, ta ut det, skaka väl under exakt 1 minut och låt svalna.

5.2.3 Tillsätt 1 ml dietyleter, sätt i proppen och skaka väl, centrifugera och överför därefter eterlösningen till ett rent och torrt rör med hjälp av en spruta.

**5.3 Beredning av silylerade derivat och förberedelser för gaskromatografi**

5.3.1 För över 100 µl lösning (5.2.3.) till ett 10 ml provrör med konisk botten med hjälp av en spruta.

5.3.2 Avlägsna lösningsmedlet med svag kvävgasström, tillsätt 200 µl silyleringsreagens (4.15.), sätt i proppen i provröret och låt stå i 20 minuter.

5.3.3 Tillsätt efter 20 minuter 1–5 ml n-hexan (beroende på de kromatografiska betingelserna): den lösning som erhålls är färdig att användas för gaskromatografi.

**5.4 Gaskromatografi**

Följande analysparametrarna används:

— Injektortemperatur ("on column"-injektor) under lösningens kokpunkt (68 °C)

— Detektortemperatur: 350 °C

— Kolonn temperatur: programmering av ugnstemperatur: 60 °C under 1 minut, öka med 15 °C per minut upp till 180 °C, sedan med 5 °C per minut upp till 340 °C, denna temperatur bibehålls sedan under 13 minuter.

— Bärargas: vätgas eller helium, reglerad till lämplig linjär hastighet för den upplösning som visas i figur 1. Retentionstiden för triglyceriden C<sub>54</sub> bör vara 40 + 5 minuter (se figur 2). (Analysparametrarna ovan är vägledande. De bör optimeras av den som utför analysen så att önskad upplösning erhålls. Toppen för 2-glycerylmonopalmitat skall ha en minsta höjd på 10 % av skrivarens skala.)

**▼ M21**

- Kvantitet av det injicerade ämnet: 0,5–1 µl av lösningen (5 ml) med n-hexan (5.3.3.).

5.4.1 *Identifiering av toppar*

De enskilda monoglyceriderna bör identifieras genom att retentions-tiderna jämförs med dem som erhållits för standardblandningar med monoglycerider under samma förhållanden.

5.4.2 *Kvantitativ analys*

Arean för varje topp beräknas med hjälp av en elektronisk integrerings-enhet.

## 6. BERÄKNING AV RESULTAT

Andelen glycerilmonopalmitat beräknas genom en jämförelse mellan arean för motsvarande topp och summan av toppareorna för samtliga monoglycerider (se figur 2), enligt formeln:

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

där:

$A_x$  = topparean för glycerilmonopalmitat

$\Sigma A$  = summan av toppareorna för alla monoglycerider

Resultatet skall anges med en decimal.

## 7. ANALYSRAPPORT

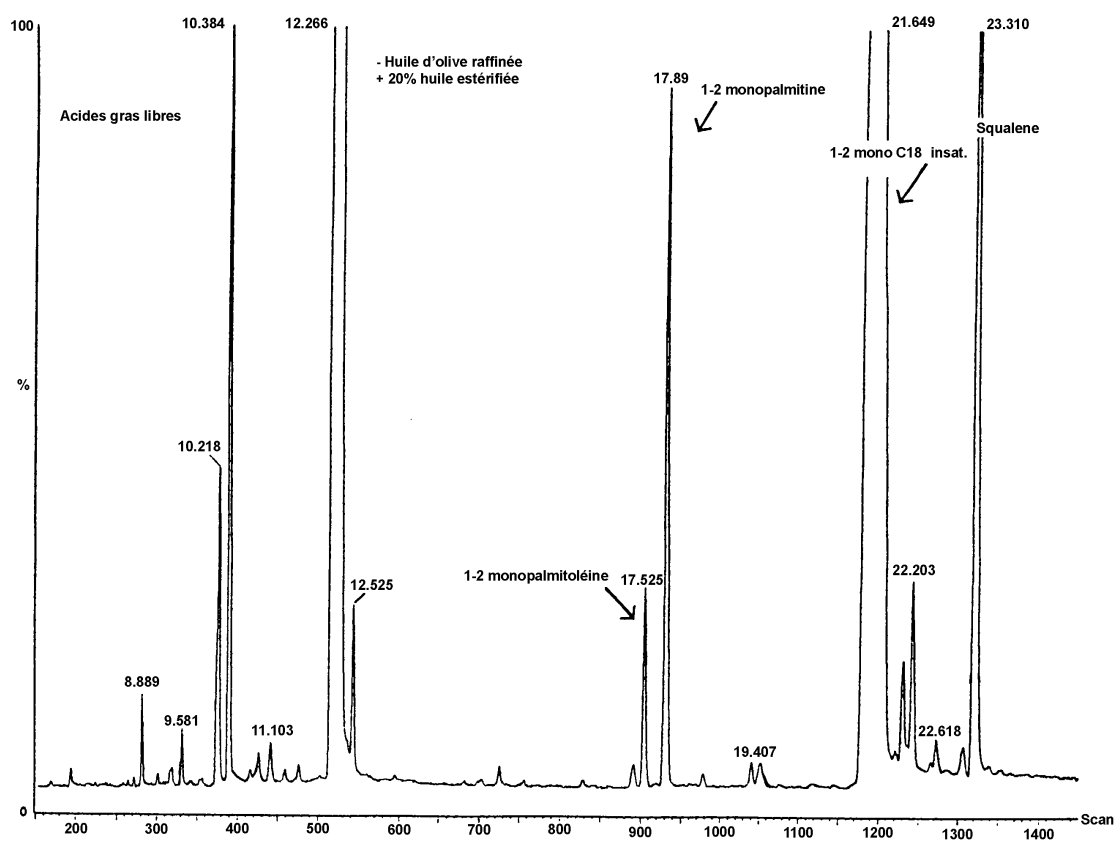
Följande skall anges i analysrapporten:

- Hänvisning till denna metod
- Alla uppgifter som behövs för att fullständigt identifiera provet
- Analysresultat
- Alla avvikelser från metoden, vare sig de hänför sig till ett beslut av de berörda parterna eller något annat skäl
- Uppgifter om laboratoriet, analysdag och underskrift av de ansvariga på laboratoriet

## ▼ M21

Figur 1

Kromatogram över reaktionsprodukter från silylering som erhållits genom att lipas fått verka på en raffinerad olivolja med tillsats av 20 % esterifierad olja (100 %).



Förklaringar: "Acides gras libres" = fria fettsyror; "Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée" = raffinerad olivolja + 20 % esterifierad olja; "1-2 monopalmitine" = 1-2 monopalmitin; "1-2 mono C<sub>18</sub> insat." = omättat 1-2-mono-C<sub>18</sub>

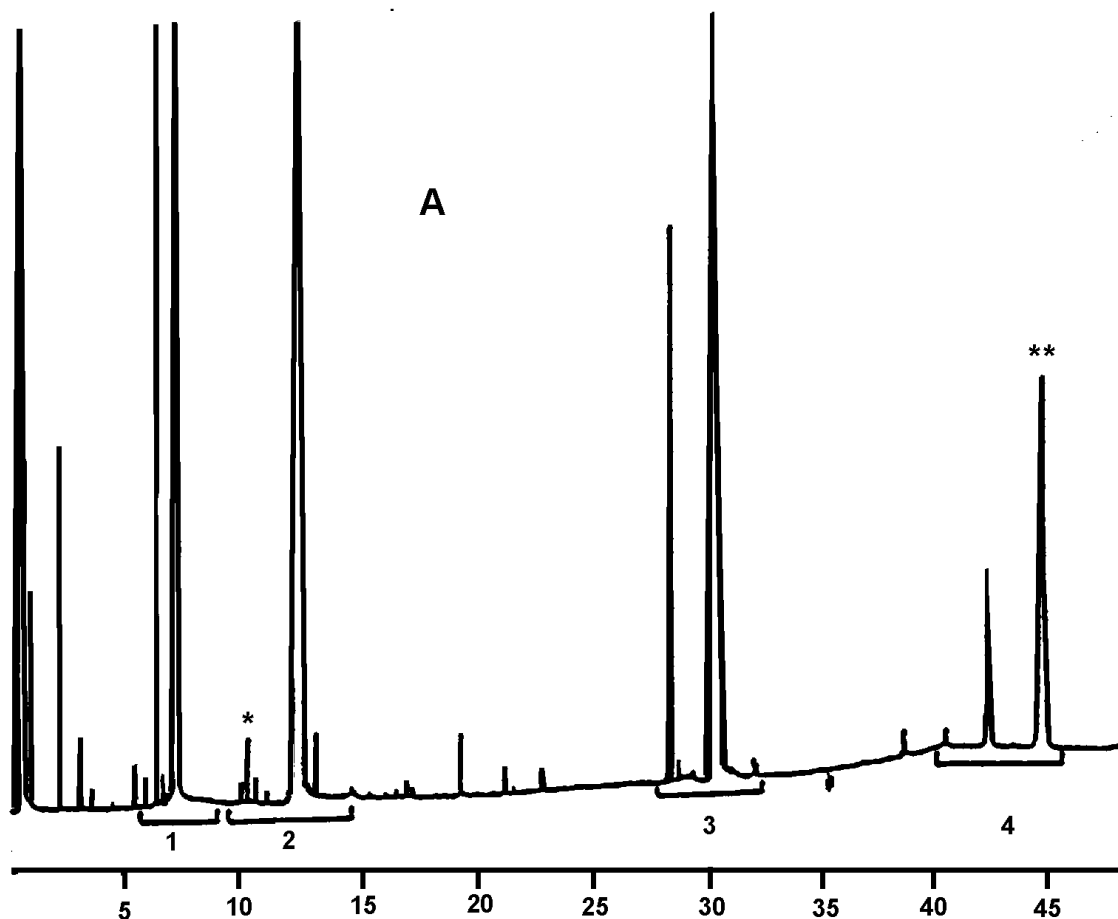
▼ M21

Figur 2

Kromatogram över:

A) Olja som inte esterifierats efter lipas; efter silylering; under dessa betingelser (kapillärkolonn 8–12 m), elueras vaxfraktionen samtidigt som diglyceridfraktionen eller kort därefter.

Efter lipaset skall triglyceridhalten inte överstiga 15 %.



Förklaringar:

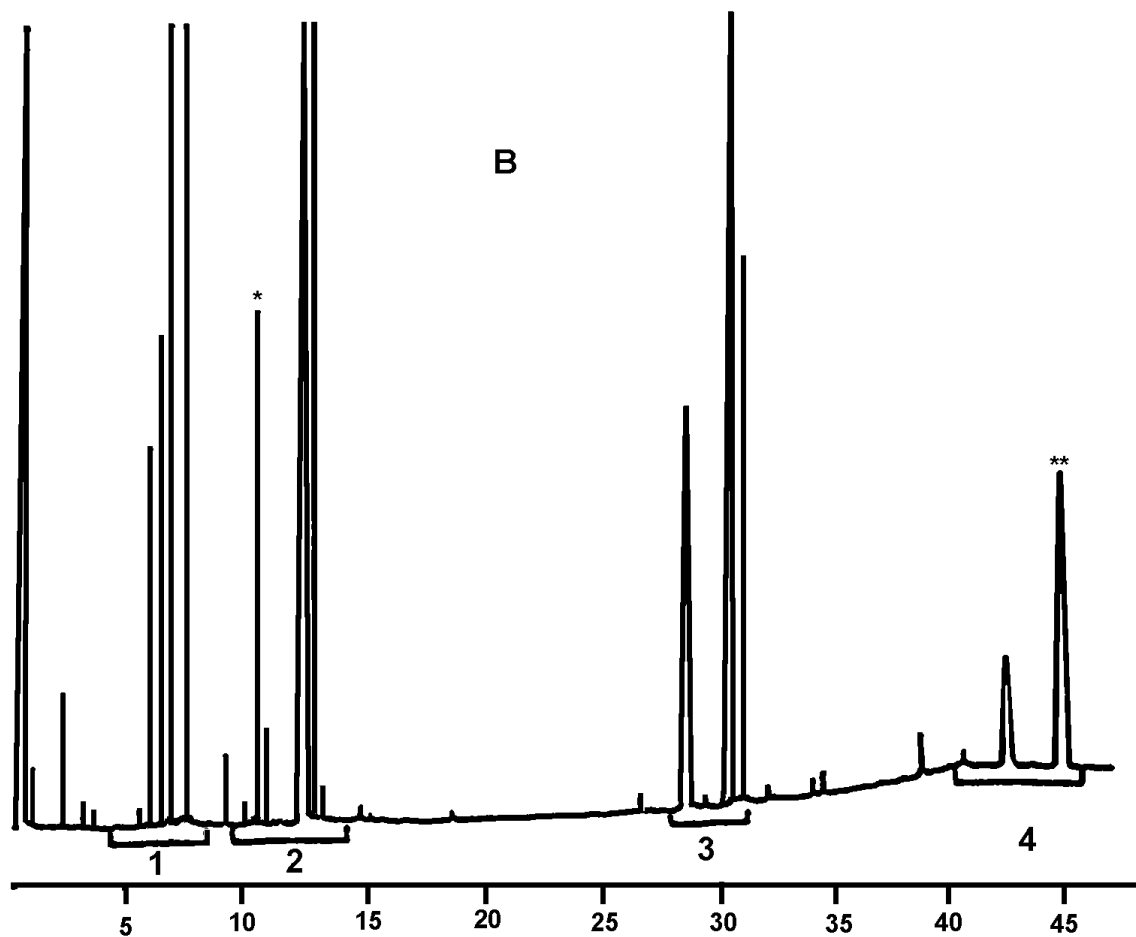
- 1.- = Fria fettsyror
- 2.- = Monoglycerider
- 3.- = Diglycerider
- 4.- = Triglycerider
- \* = 2-monopalmitin
- \*\* = Triglycerid C<sub>54</sub>

▼ M21

Kromatogram över:

B) Olja som esterifierats efter lipas; efter silylering; under dessa betingelser (kapillärkolonn 8–12 m), elueras vaxfraktionen samtidigt som diglyceridfraktionen eller kort därefter.

Efter lipaset skall triglyceridhalten inte överstiga 15 %.



*Förklaringar:*

- 1.- = Fria fettsyror
- 2.- = Monoglycerider
- 3.- = Diglycerider
- 4.- = Triglycerider
- \* = 2-monopalmitin
- \*\* = Triglycerid C<sub>54</sub>

▼ **M21**

## 8. ANMÄRKNINGAR

*Anmärkning 1:* BEREDNING AV LIPAS

I handeln finns det lipaser med lämplig aktivitet. Det går också att bereda lipas i laboratorium enligt följande:

Kyl 5 kg färsk bukspottskörtel från svin till 0 °C. Ta bort omgivande fett och bindväv och kör återstoden i mixer så att en tunn massa erhålles. Rör massan i 4–6 timmar med 2,5 liter vattenfritt aceton och centrifugera sedan. Extrahera återstoden tre gånger till med samma mängd vattenfritt aceton, och sedan två gånger med en blandning av aceton/dietyleter (1:1) (v/v) och därefter två gånger med dietyleter.

Torka återstoden i vakuum i 48 timmar så att ett stabilt pulver erhålls. Detta skall lagras i kylskåp och skyddas från fukt.

*Anmärkning 2:* KONTROLL AV LIPASAKTIVITETEN

Bered en olivoljeemulsion enligt följande:

Bered i mixer i 10 minuter en blandning av 165 ml lösning av gummi arabicum 100 g/l, 15 g krossad is och 20 ml av en neutraliserad olivolja.

Häll 10 ml av lösningen i en 50 ml glasbägare, tillsätt sedan 0,3 ml natriumkolatlösning på 0,2 g/ml och 20 ml destillerat vatten.

Placera bägaren i en termostat inställd på 37 °C. Sänk ned pH-elektroden i bägaren och lägg i omröraren.

Tillsätt med hjälp av en byrett droppvis 0,1 N natriumhydroxidlösning tills pH går upp till 8,3.

Tillsätt en mängd lipassuspension i pulverform till vattnet (0,1 g/ml lipas). När pH-värdet uppmäts till 8,3, starta kronometern och tillsätt natriumhydroxidlösningen droppvis i den takt som krävs för att pH-värdet skall ligga kvar på 8,3. Anteckna varje minut mängden använd lösning.

Plotta mätvärdena i ett koordinatsystem med tiden på x-axeln och antal ml 0,1 N alkalilösning som gått åt för att bibehålla konstant pH på y-axeln. Resultatet skall bli en rät linje.

Lipasaktiviteten mätt i lipasenheter per mg erhålls genom följande formel:

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

där:

A är aktiviteten i lipasenheter/mg

V är antalet ml 0,1 N natriumhydroxidlösning per minut (grafisk beräkning)

N är normaliteten hos natriumhydroxidlösningen

m är massan i mg av försökslipaset

Lipasenheter definieras som den mängd enzym som frigör 10 mikroekvivalenter syra per minut.

▼ **M20**

▼ **M28***BILAGA IX***SPEKTROFOTOMETRISK UNDERSÖKNING I ULTRAVIOLETT LJUS**

## INLEDNING

Spektrofotometrisk undersökning i ultraviolett ljus kan ge information om kvaliteten på ett fett, dess grad av konservering och förändringar i fettet till följd av tekniska processer. Absorptionen vid de våglängder som anges i metoden beror på närvaron av konjugerade dien- och triensystem som erhålls vid oxideringsprocesser och/eller raffineringprocesser. Absorptionen uttrycks som den specifika absorptionen  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  (absorptionen i en 1 % w/v lösning av fettet i ett angivet lösningsmedel, i en 10 mm kyvett) som konventionellt betecknas K (även kallad *absorptionskoefficient*).

## 1. SYFTE

Denna bilaga beskriver processen för att utföra en spektrofotometrisk undersökning av olivolja i det ultravioletta området.

## 2. PRINCIP

Ett prov löses i lämpligt lösningsmedel och lösningens absorbans mäts sedan vid de angivna våglängderna med rent lösningsmedel som referens.

Den specifika absorptionen vid 232 nm och 268 nm i isooktan eller 232 nm och 270 nm i cyklohexan beräknas för en koncentration av 1 % w/v i en 10 mm kyvett.

## 3. UTRUSTNING

- 3.1 En spektrofotometer för mätning av absorption på ultravioletta våglängder (220–360 nm), med en noggrannhet på 1 nm. En regelbunden kontroll rekommenderas av spektrofotometerens våglängds- och absorbansskalor samt av ströljus.

- 3.1.1 *Våglängdsskala*: Denna kan kontrolleras med hjälp av ett referensmaterial bestående av ett optiskt glasfilter innehållande holmiumoxid eller en holmiumoxidlösning (förseglade eller inte) som har distinkta absorptionsband. Referensmaterialen är utformade för kontroll och kalibrering av våglängdskalor hos spektrofotometrar för synligt och ultraviolett ljus med nominella spektrala bandbredder på 5 nm eller mindre. Mätningarna sker i förhållande till luft i våglängdsområdet 640–240 nm, enligt instruktionerna i referensmaterialen. För varje ändring av spaltbredden görs en grundkalibrering med tom strålväg. Standardens våglängder anges i certifikatet för referensmaterialet.

- 3.1.2 *Absorbansskala*: Denna kan kontrolleras med hjälp av kommersiellt tillgängliga förseglade referensmaterial bestående av sura lösningar av kaliumdikromat i vissa koncentrationer och med certifierade absorbansvärden vid  $\lambda_{\text{max}}$  (i form av fyra lösningar av kaliumdikromat i perklorosyra som är förseglade i fyra UV-kvartskyvetter för mätning av linjäritet och fotometrisk noggrannhet som referens i UV-ljus). Kaliumdikromatlösningarna mäts mot ett blankprov med den använda syran, efter grundkalibrering, enligt instruktionerna i referensmaterialen. Absorbansvärdena anges i certifikatet för referensmaterialet.

En annan möjlighet att kontrollera svaret från fotocellen och fotomultiplikatorn är att göra på följande sätt: väg in 0,2000 g rent kaliumkromat för spektrofotometri och lös detta i 0,05N kaliumhydroxidlösning i en 1 000 ml mätkolv och späd till märket. Ta ut exakt 25 ml av lösningen, överför till en 500 ml mätkolv och späd upp till märket med samma kaliumhydroxidlösning.



**▼M28**

Mät absorptionen hos lösningen vid 275 nm med användning av kaliumhydroxidlösningen som referens. Den uppmätta absorptionen med användande av 1 cm kyvett bör vara  $0,200 \pm 0,005$ .

- 3.2 Rektangulära kvartskyvetter med lock för mätning av absorption på ultravioletta våglängder (220–360 nm) och med en optisk våglängd av 10 mm. När de är fyllda med vatten eller annat lämpligt lösningsmedel bör kyvetterna inte skiljas åt mer än 0,01 enheter.
- 3.3 Mätkolvar med ett graderingsmärke, kapacitet 25 ml, klass A.
- 3.4 Analysvåg med en noggrannhet av 0,0001 g.

## 4. REAGENSER

Om inget annat anges, använd vid analysen endast reagenser som är särskilt avsedda för analysändamål och destillerat eller avmineraliserat vatten eller vatten av motsvarande renhetsgrad.

Lösningsmedel: Isooktan (2,2,4-trimetylpentan) för mätningar vid 232 nm och 268 nm och cyklohexan för mätningar vid 232 nm och 270 nm, med en absorptions på mindre än 0,12 vid 232 nm och mindre än 0,05 vid 270 nm mot destillerat vatten, mätt i en 10 mm kyvett.

## 5. UTFÖRANDE

- 5.1 Provet måste vara helt homogent och får inte innehålla några suspenderade föroreningar. Om det inte är det, måste det filtreras genom filterpapper vid ca 30 °C.
- 5.2 Väg upp ca 0,25 g (med en noggrannhet av 1 mg) av det beredda provet och överför till en 25 ml mätkolv, späd till märket med det angivna lösningsmedlet och homogenisera. Den erhållna lösningen måste vara helt klar. Vid opalescens eller grumlighet filtreras lösningen genom filterpapper.

*Anm.:* I allmänhet är en massa på 0,25–0,30 g tillräcklig för absorptionsmätningar för jungfruolja och extra jungfruolja vid 268 nm och 270 nm. För mätningar vid 232 nm behövs vanligen ett prov på 0,05 g, varför två skilda lösningar vanligen bereds. För absorptionsmätningar av olivoljor av pressrester, raffinerade olivoljor och blandade olivoljor, behövs normalt ett mindre prov, t.ex. 0,1 g, på grund av deras högre absorptions.

- 5.3 Om nödvändigt, korrigeras baslinjen (220–290 nm) med lösningsmedel i båda kvartskyvetterna (prov och referens), fyll därefter kvartskyvetten med provlösningen och mät absorptionen vid 232, 268 eller 270 nm, med lösningsmedlet som referens.

De uppmätta absorptionsvärdena måste ligga inom området 0,1–0,8 eller inom spektrofotometerens linjäritetsintervall, som bör kontrolleras. I annat fall måste mätningarna göras om med mer koncentrerad eller mer utspädd lösning.

- 5.4 Efter mätning av absorptionsen vid 268 eller 270 nm, mät absorptionsen vid  $\lambda_{\max}$ ,  $\lambda_{\max} + 4$  och  $\lambda_{\max} - 4$ . Dessa absorptionsvärden används för att bestämma variationen hos den specifika absorptionen ( $\Delta K$ ).

*Anm.:*  $\lambda_{\max}$  anses vara 268 nm för isooktan som används som lösningsmedel och 270 nm för cyklohexan.

**▼ M28**

6. REDOVISNING AV RESULTAT
- 6.1 Registrera specifik absorption (absorptionskoefficient) vid de olika våglängderna, beräknat enligt formeln

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

där:

$K\lambda$  = specifik absorption vid våglängden  $\lambda$ ,

$E\lambda$  = absorption uppmätt vid våglängden  $\lambda$ ,

$c$  = lösningens koncentration i g/100 ml,

$s$  = våglängd för kvartskvetten i cm

anges med två decimaler.

- 6.2 Variation i specifik absorption ( $\Delta K$ )

Variationen hos den specifika absorptionens absolutvärde ( $\Delta K$ ) bestäms med hjälp av formeln:

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

där  $K_m$  är den specifika absorptionen vid våglängden för maximal absorption vid 270 nm och 268 nm beroende på vilket lösningsmedel som används.

Resultaten bör anges med två decimaler.

▼ **M28***BILAGA X***BESTÄMNING AV FETTSYRAMETYLESTRAR MED GASKROMATO-  
GRAFI**

## 1. SYFTE

I denna bilaga ges vägledning om bestämning med gaskromatografi av fria och bundna fettsyror i vegetabiliska fetter och oljor efter deras omvandling till fettsyrametylestrar (Fame).

De bundna fettsyrorna av triglycerider och, beroende på esterifieringsmetod, de fria fettsyrorna, omvandlas till fettsyrametylestrar, som bestäms genom kapillärgaskromatografi.

Den metod som beskrivs i denna bilaga möjliggör bestämning av fettsyrametylestrar från C<sub>12</sub> till C<sub>24</sub>, inbegripet mättade, cis- och trans-enkelomättade och cis- och trans-fleromättade fettsyrametylestrar.

## 2. PRINCIP

Gaskromatografi (GC) används för kvantitativ analys av fettsyrametylestrar. Fettsyrametylestrar bereds enligt del A. De injiceras sedan i injektorn och förångas i denna. Separation av fettsyrametylestrar utförs på analyskolonner av bestämd polaritet och längd. En flamjoniseringsdetektor används för detektion av fettsyrametylestrar. Analysförhållandena anges i del B.

Väte eller helium kan användas som bärgas (mobil fas) i gaskromatografi av fettsyrametylestrar med flamjoniseringsdetektor. Väte påskyndar separation och ger skarpare toppar. Den stationära fasen är ett mikroskopiskt skikt som består av en tunn vätskefilm på en inert fast yta av kvartsglas.

När de förångade föreningar som analyseras passerar genom kapillärkolonnen interagerar de med den stationära fasen som täcker kolonnens inneryta. På grund av att olika föreningar interagerar på olika sätt eluerar de vid olika tidpunkter; detta kallas föreningens retentionstid för en given uppsättning analysparametrar. Jämförelsen av de olika retentionstiderna används för att identifiera de olika föreningarna.

## DEL A

**BEREDNING AV METYLESTRAR AV FETTSYROR FRÅN OLIVOLJA  
OCH FRÅN OLIVOLJA AV PRESSRESTER**

## 1. SYFTE

Denna del beskriver framställningen av metylestrar av fettsyror. Den innefattar metoder för beredning av metylestrar av fettsyror från olivolja och olivolja av pressrester.

## 2. TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Beredning av metylestrar av fettsyror från olivolja och olivolja av pressrester utförs genom transesterifiering i en metanolösning av kaliumhydroxid vid rumstemperatur. Behovet av rening av provet före transesterifieringen beror på provets innehåll av fria fettsyror och på vilken analysparameter som ska bestämmas; den kan väljas enligt följande tabell:

▼ **M28**

Kategori av olja	Metod
Jungfruolja med en halt av fria fettsyror på $\leq 2,0$ %	1. Fettsyror 2. Transfettsyror 3. $\Delta$ ECN42 (efter rening med kiselgel fastfasextraktion – SPE)
Raffinerad olivolja	
Olivolja bestående av raffinerad olivolja och jungfruolja	
Raffinerad olivolja av pressrester	
Olivolja av pressrester	
Jungfruolja med en halt av fria fettsyror $> 2,0$ % Oraffinerad olivolja av pressrester	1. Fettsyror (efter rening med kiselgel SPE) 2. Transfettsyror (efter rening med kiselgel SPE) 3. $\Delta$ ECN42 (efter rening med kiselgel SPE)

## 3. METOD

3.1 **Transesterifiering i en metanollösning av kaliumhydroxid i rumstemperatur**3.1.1 *Princip*

Metylestrar bildas genom transesterifiering i en metanollösning av kaliumhydroxid som en mellanprodukt före förtvålning.

3.1.2 *Reagenser*

3.1.2.1 Metanol med en vattenhalt som inte överstiger 0,5 % (m/m).

3.1.2.2 Hexan för kromatografi.

3.1.2.3 Heptan för kromatografi.

3.1.2.4 Dietyleter, stabiliserad för analys.

3.1.2.5 Aceton, för kromatografi.

3.1.2.6 Elueringslösning för rening av oljan genom kolonnkromatografi/SPE-kromatografi, blandning hexan/dietyleter (87:13 v/v).

3.1.2.7 Kaliumhydroxid i metanollösning, ca 2 M: lös 11,2 g kaliumhydroxid i 100 ml metanol.

3.1.2.8 Kiselgelpatroner, 1 g (6 ml), för fastfasextraktion.

3.1.3 *Utrustning*

3.1.3.1 Provrör (volym 5 ml) med skruvkork försedd med teflonpackning.

3.1.3.2 Mätpipetter eller automatpipetter, 2 ml och 0,2 ml.

▼ **M28**3.1.4 *Rening av oljeprov*

Vid behov renas proven genom att oljan får passera en kiselgelpatron för fastfasextraktion. Placera en kiselgelpatron (3.1.2.8) i en apparat för eluering i vakuum och skölj med 6 ml hexan (3.1.2.2); sköljningen utförs utan vakuum. Tillför olja (ca 0,12 g) löst i 0,5 ml hexan (3.1.2.2) i kolonnen. Låt lösningen tränga in i kiselgelen och eluera sedan med 10 ml hexan/dietyleter (87:13 v/v) (3.1.2.6). Homogenisera hela mängden eluat och dela upp det i två lika stora volymer. Låt den ena volymen avdunsta till uttorkning i en roterande evaporator under undertryck och i rumstemperatur. Lös återstoden i 1 ml heptan. Den erhållna lösningen är färdig för analys av fettsyror med gaskromatografi. Låt den andra volymen avdunsta och lös upp återstoden i 1 ml aceton för analys av triglycerider med vätskekromatografi (HPLC) om nödvändigt.

3.1.5 *Utförande*

Mät upp ca 0,1 g av oljeprovet i ett 5 ml provrör med skruvkork (3.1.3.1). Tillsätt 2 ml heptan (3.1.2.2) och skaka. Tillsätt 0,2 ml 2 M metanollösning av kaliumhydroxid (3.1.2.7), tillslut väl med en kork försedd med teflonpackning och skaka kraftigt i 30 sekunder. Låt provröret stå tills lösningens övre skikt har klarnat. Häll av det övre skiktet, som innehåller metylestrarna. Heptanlösningen är färdig att injiceras i kromatografen. Det är lämpligt att förvara lösningen i kylskåp fram till dess att analysen med kromatografi ska ske. Lösningen bör ej stå längre tid än tolv timmar.

## DEL B

**ANALYS AV FETTSYRAMETYLESTRAR MED GASKROMATOGRAFI**

## 1. SYFTE

Denna del ger allmänna riktlinjer för tillämpning av gaskromatografi på kapillärkolonn för att bestämma den kvalitativa och kvantitativa sammansättning av en blandning av fettsyrametylestrar som erhållits i enlighet med den metod som anges i del A.

Delen är inte tillämplig på polymeriserade fettsyror.

## 2. REAGENSER

2.1 **Bärgas**

Inert gas (helium eller väte) som är omsorgsfullt torkad och med en syrehalt som är mindre än 10 mg/kg.

*Anm. 1:* Väte kan fördubbla analys hastigheten men är farlig. Säkerhetsanordningar finns att tillgå.

2.2 *Suppleterande gaser*

2.2.1 Väte (renhet  $\geq 99,9$  %) utan organiska föroreningar.

2.2.2 Luft eller syre utan organiska föroreningar.

2.2.3 Kväve (renhet  $> 99$  %)

2.3 **Standard för referens**

Blandning av metylestrar av rena fettsyror eller metylestrar av ett fett av känd sammansättning, företrädesvis liknande det fett som ska analyseras. Cis- och transisomerer av metylestrar av oktadekensyra, oktadekadiensyra och oktadekatriensyra kan användas för att identifiera transisomerer av omättade fettsyror.

Försiktighet bör iaktas för att förhindra oxidation av fleromättade fettsyror.

**▼ M28****3. UTRUSTNING**

De anvisningar som ges här avser vanlig utrustning som används för gaskromatografi, som använder kapillärkolonner och en flamjoniseringsdetektor.

**3.1 Gaskromatograf**

Gaskromatografen ska bestå av följande enheter:

**3.1.1 Injektionssystem**

Använd ett injektionssystem med kapillärkolonner, varvid injektionssystemet bör vara speciellt konstruerat för användning med sådana kolonner. Injektorn kan vara med eller utan split.

**3.1.2 Ugn**

Ugnen ska kunna värma kapillärkolonnen till en temperatur av minst 260 °C och upprätthålla den önskade temperaturen inom 0,1 °C. Det senaste kravet är särskilt viktigt när kvartsrör används.

Användning av temperaturprogrammerad uppvärmning rekommenderas i alla fall och särskilt för fettsyror med mindre än 16 kolatomer.

**3.1.3 Kapillärkolonn**

3.1.3.1 Rör som är tillverkade av ett material som är inert för ämnen som ska analyseras (vanligen glas eller kvarts). Innerdiametern ska vara mellan 0,20 och 0,32 mm. Den inre ytan ska genomgå en lämplig behandling (t ex ytpreparering, inaktivering) innan den får täckning av den stationära fasen. En längd av 60 m räcker för fettsyror och cis- och transisomerer av fettsyror.

3.1.3.2 Stationär fas, polär polysiloxan (cyanopropylsilikon) tvärbundna kolonn-fyllningar är lämpliga.

*Anm. 2:* Det finns en risk att polära polysiloxaner kan ge upphov till svårighet att identifiera och separera linolensyra och C<sub>20</sub>-syror.

Beläggningen ska vara tunn, dvs 0,1 till 0,2 µm.

3.1.3.3 Sammansättning och konditionering av kolonnen

Följ de normala försiktighetsåtgärderna för att sätta ihop kapillärkolonnerna, dvs. placeringen av kolonnen i ugnen (bärare) val och sammansättning av skarvar (läckaget) placering av kolonnens in- och utlopp i injektorn och detektor (minskning av dödutrymmen). Placera kolonnen i en ström av bärgas (t.ex. 0,3 bar [30 kPa] för en kolonn med längden 25 m och en innerdiameter på 0,3 mm).

Behandla kolonnen genom temperaturprogrammering av ugnen till 3 °C/minut från omgivningstemperaturen till en temperatur som är 10 °C under sönderfallsgränsen för den stationära fasen. Håll ugnen vid denna temperatur i en timme, tills baslinjen har stabiliserats. Gå tillbaka till 180 °C för att arbeta under isoterma förhållanden.

*Anm. 3:* Lämpliga förbehandlade kolonner finns tillgängliga i handeln.

3.1.4 *Flamjonisationsdetektor och omformarförstärkare*

**3.2 Sprutor**

Sprutorna ska ha en maximivolymer av 10 µl med 0,1 µl gradering.

**3.3 System för datainsamling**

System för datainsamling, som är uppkopplade online med detektorer och används med en programvara som lämpar sig för integrering av toppar och normalisering.

▼ **M28**

## 4. UTFÖRANDE

De arbeten som beskrivs i 4.1 till 4.3 avser användning av en flamjoniseringsdetektor.

4.1 **Provningsförhållanden**4.1.1 *Val av optimala provningsförhållanden för kapillärkolonner*

På grund av effektivitets- och permeabilitetsegenskaperna hos kapillärkolonnen är separationen mellan komponenterna och tiden för analysen i hög grad beroende av flödes hastigheten på bärgasen i kolonnen. Det är därför nödvändigt att optimera driftförhållandena genom att anpassa denna parameter (eller, enklare, tryckfallet i kolonnen) beroende på om man önskar förbättra separationen eller påskynda analysen.

Följande villkor har visat sig vara lämpliga för separation av fettsyrametylestrar (C<sub>4</sub>–C<sub>26</sub>). Exempel på kromatogram visas i tillägg B:

Injektortemperatur:	250 °C
Detektortemperatur:	250 °C
Ugnstemperatur:	165 °C (8 minuter) till 210 °C med 2 °C/min.
Bärgas väte:	tryck i kolonninloppet 179 kPa
Totalt flöde:	154,0 ml/min
Delningsförhållande:	1:100
Injektionsvolym:	1 µl

4.1.2 *Bestämning av upplösningen (se tillägg A)*

Beräkna upplösningen R för två angränsande toppar I och II med hjälp av formeln

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)}) / (\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ eller } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (Förenta Staternas farmakopé),}$$

eller

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

(JP [Japanska farmakopén], EP [Europeiska farmakopén], BP [Brittiska farmakopén])

där:

$d_{r(I)}$  är retentionsavståndet för topp I,

$d_{r(II)}$  är retentionsavståndet för topp II,

$t_{r(I)}$  är retentionstiden för topp I,

$t_{r(II)}$  är retentionstiden för topp II,

$\omega_{(I)}$  är bredden av basen av topp I,

$\omega_{(II)}$  är bredden av basen av topp II,

$\omega_{0,5}$  är toppbredden av den angivna föreningen, vid mitten av toppen,

Om  $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$ , beräkna R med hjälp av följande formler:

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

där:

$\sigma$  är standardavvikelsen (se tillägg A, figur 1).

▼ **M28**

Om avståndet  $d_r$  mellan de två topparna  $d_{r(II)} - d_{r(I)}$  är lika med  $4\sigma$ , är upplösningsfaktorn  $R = 1$ .

Om två toppar inte är helt åtskilda skär tangenterna till de två topparnas inflexionspunkter varandra i punkt C. För att de två topparna ska vara helt åtskilda, måste avståndet mellan de två topparna vara lika med:

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

## 5. RESULTATANGIVELSER

5.1 **Kvalitativ analys**

Identifiera provets metylestertoppar från kromatogrammet i tillägg B, figur 1, om så behövs genom interpolering eller genom en jämförelse med dessa blandningar av metylestrar (som anges i punkt 2.3).

5.2 **Kvantitativ analys**5.2.1 *Bestämning av sammansättningen*

Beräkna massfraktionen  $w_i$  av de enskilda fettsyrametylestrarna, uttryckt som massprocent av metylestrar, enligt följande:

5.2.2 *Beräkningssätt*

## 5.2.2.1 Allmänt fall

Beräkna halten av en given komponent  $i$ , uttryckt som massprocent av metylestrar, genom att bestämma hur stor procentandel den motsvarande toppens area utgör i förhållande till summan av areorna för alla topparna, med användning av formeln:

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

där:

$A_i$  är arean under toppen för den enskilda fettsyrametylestern  $i$ ,

$\Sigma A$  är summan av areorna under alla topparna för samtliga enskilda fettsyrametylestrar.

Resultaten uttrycks med två decimaler.

*Anm. 4:* För fetter och oljor är massfraktionen av fettsyrametylestrar lika med massfraktionen av triglyceriderna i gram per 100 g. För de fall där detta antagande inte är tillåtet, se 5.2.2.2.

## 5.2.2.2 Användning av korrektionsfaktorer

I vissa fall, t.ex. i närvaro av fettsyror med färre än åtta kolatomer eller fettsyror med sekundära grupper, ska areorna korrigeras med specifika korrektionsfaktorer ( $F_{ci}$ ). Dessa faktorer ska fastställas för varje enskilt instrument. För detta ändamål ska lämpliga referensmaterial med certifierad fettsyrasammansättning i motsvarande intervall användas.

*Anm. 5:* Dessa korrektionsfaktorer är inte identiska med de teoretiska FID-korrektionsfaktorer som anges i tillägg A, eftersom de också innefattar injektionssystemets prestanda etc. När det gäller större skillnader, bör dock hela systemet kontrolleras med avseende på resultat.



▼ **M28**

För denna referensblandning erhålls massprocenten av Fame  $i$  genom formeln

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

där

$m_i$  är massan hos Fame  $i$  i referensblandningen,

$\Sigma m$  är den totala massan av de olika komponenterna som Fame  $i$  i referensblandningen.

Beräkna ur kromatogrammet för referensblandningen procenten per area för komponent Fame  $i$  på följande sätt:

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

där:

$A_i$  är arean för Fame  $i$  i referensblandningen,

$\Sigma A$  är summan av areorna för alla fettsyrametylestrarna i referensblandningen.

Korrektionsfaktorn  $F_c$  är sedan

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

För provet är massprocenten av varje fettsyrametylester  $i$ :

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

Resultaten uttrycks med två decimaler.

*Anm. 6:* Det beräknade värdet motsvarar massprocenten av den enskilda fettsyran beräknad som triglycerider per 100 g fett.

## 5.2.2.3 Användning av intern standard

I vissa analyser (t.ex. där inte alla fettsyror är kvantifierade, såsom när syror med 4 och 6 kolatomer är närvarande tillsammans med syror med 16 och 18 kolatomer, eller när det är nödvändigt att bestämma den absoluta mängden fettsyror i ett prov) är det nödvändigt att använda en intern standard. Fettsyror med 5, 15 eller 17 kolatomer används ofta. Korrektionsfaktorn (om sådan finns) för den interna standarden bör bestämmas.

Massprocenten av komponenten  $i$ , uttryckt som metylestrar, erhålls genom formeln:

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

där:

$A_i$  är arean för Fame  $i$ ,

$A_{IS}$  är arean för den interna standarden,

$F_i$  är korrektionsfaktorn för fettsyran  $i$ , uttryckt som Fame,

$F_{IS}$  är korrektionsfaktorn för den interna standarden,

$m$  är massan av provet, i milligram,

$m_{IS}$  är massan av den interna standarden, i milligram.

Resultaten uttrycks med två decimaler.

**▼ M28****6. PROVRAPPORT**

Provrapporten ska ange de metoder som används för framställning av metylestrarna och för gaskromatografanalysen. Den ska också ange alla driftsdetaljer som inte anges i denna standardmetod eller som betraktas som tillägg tillsammans med enskildheter om varje incident som kan ha påverkat resultaten.

Provrapporten ska innehålla all information som behövs för en komplett identifiering av provet.

**7. PRECISION****7.1 Resultat av provningsjämförelse**

Uppgifter om en jämförelse mellan laboratorier avseende metodens precision anges i bilaga C till standard IOC/T.20/Doc. Nr 33. De värden som härrör från denna provningsjämförelse behöver inte vara tillämpbara för andra koncentrationsintervall- och koncentrationsmatriser än dem som anges.

**7.2 Repeterbarhet**

Den absoluta skillnaden mellan två oberoende enskilda provresultat, som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i samma laboratorium av samma person som använder samma utrustning inom en kort tidsintervall, kommer i högst 5 % av fallen att vara större än  $r$  som anges i tabellerna 1–14 i bilaga C till standard IOC/T.20/Doc. Nr 33.

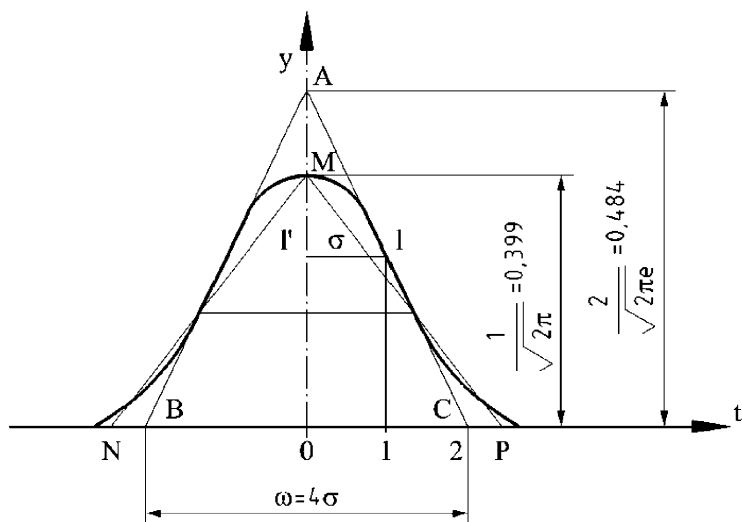
**7.3 Reproducerbarhet**

Den absoluta skillnaden mellan två enskilda provresultat som har erhållits med samma metod på identiskt provmaterial i olika laboratorier av olika personer som använder olika utrustning, kommer i högst 5 % av fallen att vara större än  $R$  som anges i tabellerna 1–14 i bilaga C till standard IOC/T.20/Doc. Nr 33.

▼ M28

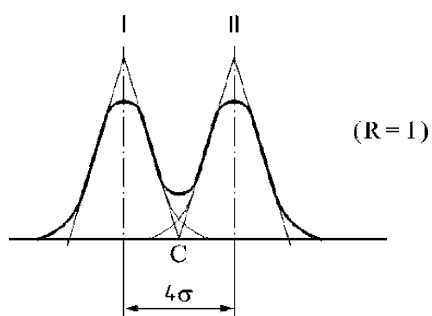
Tillägg A

Figur 1

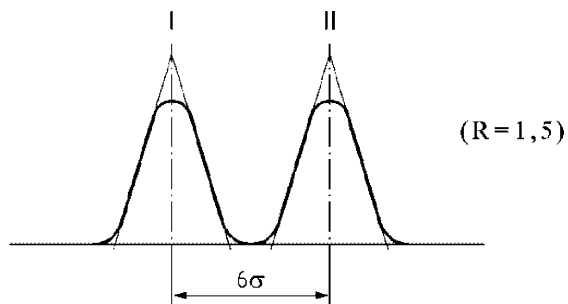


Med  $\omega_{0,5}$  bredd på halva höjden av triangeln (ABC) och  $b$  bredd på halva höjden av triangeln (NPM).

Figur 2



Figur 3

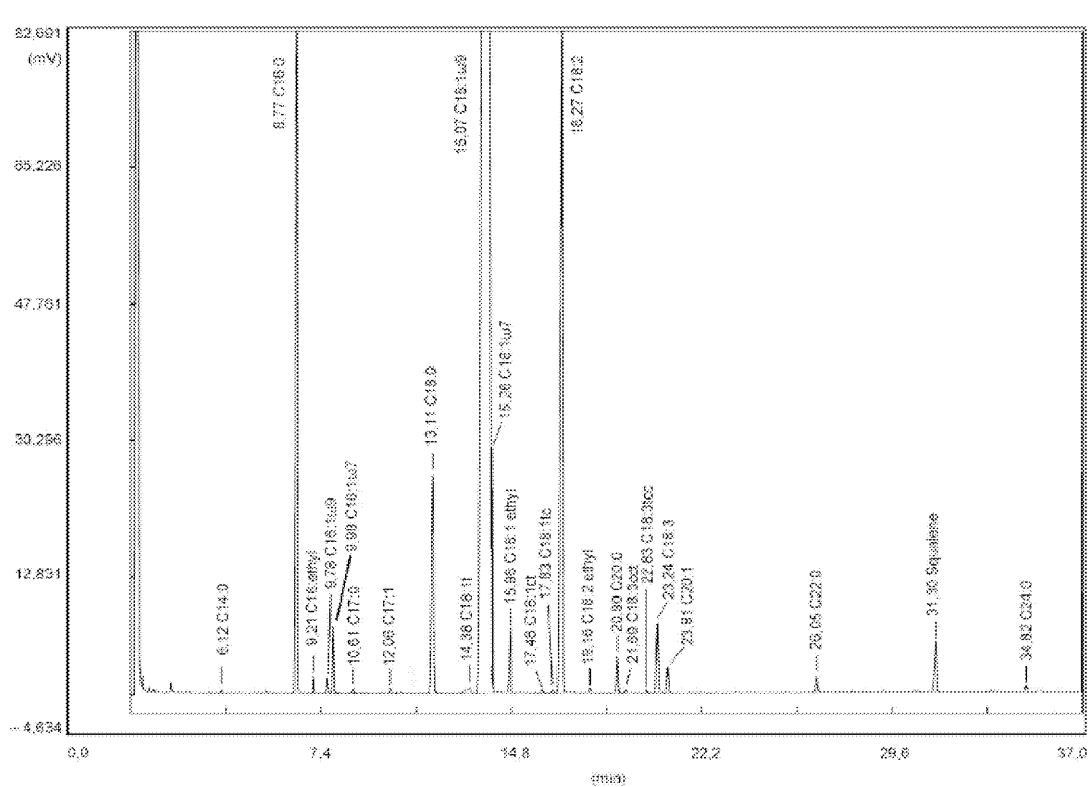


▼M28

## Tillägg B

Figur 1

Kromatografisk profil för en olivolja av pressrester, erhållen genom metoden för metylering vid låg temperatur



De kromatografiska topparna motsvarar metyl- och etylestrarna om inget annat anges.



## BILAGA XI

BESTÄMNING AV HALTEN FLYKTIGA HALOGENERADE  
LÖSNINGSMEDEL I OLIVOLJA

## 1. METOD

Analys med gaskromatografi med användning av joniseringsteknik (*head space*).

## 2. UTRUSTNING

2.1 Gaskromatografiapparat utrustad med elektronabsorptionsdetektor (ECD).

2.2 Huvudutrymmesapparat (*head space*).

2.3 Gaskromatografikolonn, av glas, 2 meter lång och 2 mm i diameter, stationär fas.

OV101 10 % eller motsvarande uppsugen i kalcinerad diatomjord, syramätad och silaniserad med en partikelstorlek på 80 till 100 mesh.

2.4 Bärar- och supplementerande gaser: Kväve för gaskromatografi, lämplig för elektrondetektor.

2.5 Glaskolvar, 10 till 15 ml, med teflonskikt och aluminiumpropp med membran för sprutor (septum).

2.6 Förslutningsklämmor.

2.7 Gassprutor 0,5 till 2 ml.

## 3. REAGENSER

Standard: halogenerat lösningsmedel med en renhet som är lämplig för gaskromatografi.

## 4. UTFÖRANDE

4.1 Väg exakt in ca 3 g olja i en glaskolv (som inte skall återanvändas) och förslut den hermetiskt. Placera med en termostat vid 70 °C i en timme. Med hjälp av en spruta, ta försiktigt bort 0,2 till 0,5 ml av gasutrymmet (*head space*). Injicera detta i kolonnen på gaskromatografen som har följande inställningar:

— injektortemperatur 150 °C

— kolonntemperatur 70 till 80 °C

— detektortemperatur 200 till 250 °C

Andra temperaturer kan också användas under förutsättning att resultaten blir de motsvarande.

4.2 Referenslösningar: Gör i ordning standardlösningar av raffinerad olivolja som inte innehåller spår av lösningsmedel med koncentrationer som sträcker sig från 0,05 till 1 ppm (mg/kg) och motsvarande för det antagna innehållet i provet. De halogenerade lösningsmedlen kan spädas ut med användning av pentan.

4.3 Kvantitativ uppskattning: Korrelera områdena eller höjderna på topparna på provet och på standardlösningar hos den koncentration som ligger närmast. Om avvikelser är större än 10 % måste analysen upprepas i jämförelse med en annan standardlösning tills avvikelserna ligger inom 10 %. Halten bestäms på grundval av genomsnittet av de ursprungliga insprutningarna.

4.4 Resultatangivelse: Resultaten uttrycks i ppm (mg/kg). Registreringsgränsen för metoden är 0,01 mg/kg.

▼ **M26**

## BILAGA XII

**INTERNATIONELLA OLIVOLJERÅDETS METOD FÖR  
ORGANOLEPTISK BEDÖMNING AV JUNGFRUOLJA**▼ **M28**

## 1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Avsikten med den internationella metod som beskrivs i denna bilaga är att fastställa ett förfarande för att bedöma organoleptiska egenskaper hos jungfruolja i enlighet med del VIII punkt 1 i bilaga VII till Europaparlamentets och rådets förordning (EU) nr 1308/2013 <sup>(1)</sup> och metoden för att klassificera jungfruolja på grundval av dessa egenskaper. Metoden innehåller dessutom anvisningar för en frivillig märkning.

Den angivna metoden är bara tillämplig på jungfruoljor och deras klassificering eller märkning med avseende på hur intensiva de uppfattade defekterna är och med avseende på fruktighet och övriga positiva egenskaper, vilket fastställs av en utvald grupp utbildade provsmakare, som utgör en panel.

Det är den senast tillgängliga versionen av Olivoljarådets standarder, som nämns i denna bilaga.

▼ **M26**

## 2. ALLMÄN GRUNDLÄGGANDE TERMINOLOGI FÖR SENSORISK ANALYS

Se standard IOC/T.20/Doc. Nr 4 ”Sensorisk analys: Allmän grundläggande terminologi”

## 3. SÄRSKILD TERMINOLOGI

3.1. **Negativa egenskaper**

*Unken/Gyttjig fällning* Karakteristisk doft och smak hos olja från oliver som lagts på hög eller lagrats under sådana förhållanden att de är i långt framskriden anaerob jäsning, eller hos olja som varit i kontakt med ”gyttjig” fällning i fat eller tankar och som också har genomgått en process av anaerob jäsning.

*Möglig - fuktig - jordig* Karakteristisk doft och smak hos oljor som framställts av frukt där svamp och jäst har utvecklats, beroende på att de lagrats under fuktiga förhållanden i flera dagar eller av olja som framställts av oliver som har samlats in utan att jord eller gytjia tvättats bort.

*Vin-vinäger-sur-syrlig* Karakteristisk doft och smak hos vissa oljor som påminner om vin eller vinäger. Detta beror i första hand på en process av anaerob jäsning i oliverna eller i rester av olivmassa i mattor som inte har rengjorts ordentligt, som leder till att det bildas ättiksyra, etylacetat och etanol.

*Härsken* Doft och smak hos oljor som har genomgått en intensiv oxidationsprocess.

*Frostskadade oliver (fuktigt trä)* Karakteristisk doft och smak hos oljor som framställts av oliver som har utsatts för frost på trädet.

<sup>(1)</sup> Europaparlamentets och rådets förordning (EU) nr 1308/2013 av den 17 december 2013 om upprättande av en samlad marknadsordning för jordbruksprodukter och om upphävande av rådets förordningar (EEG) nr 922/72, (EEG) nr 234/79, (EG) nr 1037/2001 och (EG) nr 1234/2007 (EUT L 347, 20.12.2013, s. 671).

▼ **M28**3.1.1 *Andra negativa egenskaper*

<i>Värmd eller bränd</i>	Karakteristisk doft och smak hos oljor, som orsakats av alltför hög och/eller långvarig uppvärmning under bearbetningen, i synnerhet när massan blandas termiskt, om detta sker under olämpliga förhållanden.
<i>Hö-trä</i>	Karaktäristisk doft och smak hos vissa oljor som framställts av oliver som har torkats.
<i>Rå</i>	En tjock, degliknande fönimmelse i munnen som vissa gamla oljor kan ge.
<i>Fet</i>	Doft och smak av olja som påminner om dieselolja, fett eller mineralolja.
<i>Växtvatten</i>	Doft och smak som uppstått på grund av längre kontakt med växtvatten som har genomgått en jäsningsprocess.
<i>Saltlake</i>	Doft och smak av olja som framställts av oliver som konserverats i saltlösning.
<i>Metallisk</i>	Doft och smak som påminner om metall. Den är karaktäristisk för oljor som har varit i längre kontakt med metalliska ytor under krossning, blandning, pressning eller förvaring.
<i>Esparto</i>	Karakteristisk doft och smak hos olja som framställts av oliver som pressats i nya espartomattor. Doften och smaken kan variera beroende på om mattorna är tillverkade av färskt eller torkat espartogräs.
<i>Maskig</i>	Doft och smak av olja som framställts av oliver som har varit utsatta för kraftiga attacker av larver från olivflugan ( <i>Bactrocera oleae</i> ).
<i>Gurka</i>	Doft och smak som uppstår när en olja är hermetiskt förpackad under alltför lång tid, särskilt i bleckbehållare, och som anses bero på att 2,6-nonadienal bildats.

3.2 **Positiva egenskaper**

<i>Fruktig</i>	Uppsättning olfaktoriska sensationer karaktäristisk för olja, som beror på sorten och kommer från friska, färska oliver, antingen mogna eller omogna. Den förnims direkt och/eller via näsans bakre gångar.
<i>Bitter</i>	Karaktäristisk primär smak hos oljor som framställts av gröna oliver eller oliver som börjar ändra färg. Den uppfattas med vallgravspapillerna som ligger i V-form på tungan.
<i>Skarp</i>	Stickande intryck karaktäristiskt för olja som framställts i början av säsongen, i huvudsak av oliver som fortfarande är omogna. Det kan förnimmas i hela munhålan, i synnerhet i halsen.

▼ **M29**3.3 **Frivillig terminologi för märkning**

Den som leder panelen får på begäran intyga att de oljor som bedömts överensstämmer med definitioner och intervall som endast motsvarar följande termer med avseende på egenskapernas intensitet och fönimmelsen av dem.

▼ **M29**

Positiva egenskaper (fruktig, bitter och skarp): Enligt förnimmelsens intensitet:

- *Stark*, om medianvärdet för egenskapen är över 6.
- *Medelstark*, om medianvärdet för egenskapen är mellan 3 och 6.
- *Svag*, om medianvärdet för egenskapen är under 3.

*Fruktighet* En uppsättning olfaktoriska förnimmelser som är kännetecknande för oljan och som beror på sorten och kommer från friska, färska oliver i vilka varken grön eller mogen fruktighet dominerar. Den förnims direkt och/eller via näsans bakre gångar.

*Omogen fruktighet* En uppsättning olfaktoriska förnimmelser som är kännetecknande för oljan och som påminner om omogna frukter och som beror på sorten och kommer från omogna, friska, färska oliver. Den förnims direkt och/eller via näsans bakre gångar.

*Mogen fruktighet* En uppsättning olfaktoriska förnimmelser som är kännetecknande för oljan och som påminner om mogna frukter och som beror på sorten och kommer från friska, färska oliver. Den förnims direkt och/eller via näsans bakre gångar.

*Välbalanserad* Olja som inte är obalanserad i fråga om de olfaktoriska-smakmässiga och taktila intrycken där medianvärdet för egenskaperna bitter och/eller skarp inte är två poäng högre än medianvärdet för fruktighet.

*Mild olja* Olja för vilken medianvärdet för egenskaperna bitter och skarp är 2 eller lägre.

Förteckning över termer som avser förnimmelsens intensitet:

Termer som får användas om ett intyg från en organoleptisk provning kan visas upp	Medianvärde för egenskapen
Fruktighet	—
Mogen fruktighet	—
Omogen fruktighet	—
Mild fruktighet	Lägre än 3
Medelfruktighet	Mellan 3 och 6
Kraftig fruktighet	Mer än 6
Svagt mogen fruktighet	Lägre än 3
Medelmogen fruktighet	Mellan 3 och 6
Kraftig mogen fruktighet	Mer än 6
Svag omogen fruktighet	Lägre än 3



▼ **M29**

Termer som får användas om ett intyg från en organoleptisk provning kan visas upp	Medianvärde för egenskapen
Medelomogen fruktighet	Mellan 3 och 6
Kraftig omogen fruktighet	Mer än 6
Svag bitterhet	Lägre än 3
Medelbitter	Mellan 3 och 6
Kraftig bitterhet	Mer än 6
Kraftigt stark	Lägre än 3
Medelstark	Mellan 3 och 6
Kraftigt stark	Mer än 6
Välbalanserad olja	Medianvärdet för egenskaperna bitter och skarp är inte mer än två poäng högre än medianvärdet för fruktighet.
Mild olja	Medianvärdet för egenskaperna bitter och skarp är inte högre än 2.

▼ **M26**

4. GLAS FÖR PROVSMAKNING AV OLJA  
Se standard IOC/T.20/Doc. Nr 5, ”Glas för provsmakning olja”.
5. PROVNINGSRUM  
Se standard IOC/T.20/Doc. Nr 6, ”Anvisningar för installation av ett provningsrum”.
6. TILLBEHÖR  
Följande tillbehör, som krävs för att provsmakare ska kunna utföra sina uppgifter på ett tillfredsställande sätt, ska tillhandahållas i varje bås och måste ligga inom räckhåll:
  - Glas (standardiserade) innehållande proverna, numrerade med en kod, täckta med ett urglas och förvarade vid  $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .
  - Profilformulär (se figur 1) i pappersformat eller i digital form under förutsättning att villkoren för profilformuläret är uppfyllda, samt anvisningar för användningen vid behov.
  - Kulspetspenna eller outplånligt bläck.
  - Brickor med äppelskivor och/eller vatten, kolsyrehaltigt vatten och/eller skorpor.
  - Glas med rumstempererat vatten.
  - Ett formulär med de allmänna reglerna enligt avsnitt 8.4 och 9.1.1.
  - Spottkoppar.

**▼ M26**

## 7. PANELLEDARE OCH PROVSMAKARE

7.1. **Panelledare**

Panelledaren måste vara en person med lämplig utbildning och expertkunskaper om de typer av oljor som han eller hon kommer att stöta på i samband med sitt arbete. Panelledaren är en nyckelfigur i panelen och ansvarar för dess organisation och drift.

Panelledarens arbete kräver grundläggande utbildning om verktyg för sensorisk analys, sensorisk skicklighet, noggrannhet vid förberedelse, organisation och utförande av proven, samt skicklighet och tålmod då det gäller att planera och utföra proverna på ett vetenskapligt sätt.

Panelledaren är den enda ansvariga personen för urval, utbildning och övervakning av provsmakarna för att fastställa deras nivå av skicklighet. Panelledarna är således ansvariga för bedömningen av provsmakarna, som alltid måste vara objektiva och för vilka de måste utarbeta särskilda förfaranden som bygger på provningar och solida kriterier för godkännande och avvisande. Se standard IOC/T.20/Doc. Nr 14, ”Anvisningar för urval, utbildning och kontroll av kvalificerade provsmakare av jungfruolja”.

Panelledaren ansvarar för panelens resultat och därmed även för utvärderingen av den, där de måste presentera tillförlitliga, objektiva bevis. De måste hur som helst visa att metoden och provsmakarna står under kontroll. Periodisk kalibrering av panelen rekommenderas (IOC/T.20/Doc. nr 14, § 5).

Panelledarna har det yttersta ansvaret för att föra panelens protokoll. Dessa protokoll måste alltid vara spårbara. De måste överensstämja med de revisionsförklaringar och kvalitetskrav som fastställs i internationella standarder för sensorisk analys och säkerställa anonymitet hos exemplaren vid alla tidpunkter.

De ska ansvara för inventering och se till att den utrustning och det material som krävs för att uppfylla specifikationerna för denna metod är ordentligt rengjorda och underhålls och ska bevara skriftliga bevis på detta, samt ansvara för överensstämmelsen med testvillkoren.

De ska ansvara för att ta emot och förvara proverna vid ankomsten till laboratoriet samt ansvara för deras förvaring efter proven. De ska då vid varje tidpunkt säkerställa att proverna förblir anonyma och är förvarade på rätt sätt, och de måste för detta syfte utarbeta skriftliga förfaranden för att säkerställa att hela processen är spårbar och ger garantier.

Vidare ansvarar de för att förbereda, koda och presentera proverna för provsmakarna i enlighet med en lämplig försöksplan i enlighet med på förhand fastställda protokoll samt för sammanställning och statistisk bearbetning av de uppgifter som erhållits av provsmakarna.

De ska ansvara för utveckling och utarbetande av alla andra förfaranden som kan krävas för att komplettera denna standard och att se till att panelen fungerar väl.

De måste hitta metoder för att jämföra resultaten från panelen med resultaten från andra paneler som analyserar jungfruolja, för att ta reda på om panelen fungerar väl.

**▼ M26**

Det åligger panelledaren att motivera panelmedlemmarna genom att uppmuntra deras intresse, nyfikenhet och tävlingslust. Därför rekommenderas de starkt att säkerställa en smidig tvåvägskommunikation med panelmedlemmarna genom att hålla dem informerade om alla uppgifter som de utför och de resultat som erhålls. De ska också se till att deras yttrande inte är känt och ska förhindra eventuella ledare från att hävda sina kriterier framför övriga provsmakare.

De ska kalla provsmakarna i tillräckligt god tid och besvara alla frågor om utförandet av proven, men avstå från att antyda några åsikter om provet.

**▼ M28**7.1.1 *Ställföreträdande panelledare*

Panelledaren får, av väl motiverade skäl, ersättas av en ställföreträdande panelledare som får träda i dennes ställe vid uppgifter som rör utförandet av provena. Ställföreträdaren måste ha de nödvändiga färdigheter som krävs av panelledaren.

7.2. **Provsmakare**

De personer som fungerar som provsmakare i organoleptiska analyser av olivoljor måste göra detta frivilligt. Det är därför tillrådligt att den som önskar delta inkommer med en skriftlig ansökan. Kandidaterna ska väljas ut, utbildas och kontrolleras av panelledaren i enlighet med deras skicklighet när det gäller att skilja mellan likartade prov. Det bör hållas i minnet att deras tillförlitlighet ökar med utbildning.

Provsmakare måste fungera som verkliga sensoriska observatörer och åsidosätta sin personliga smak och endast rapportera om sina sinnesintryck. Därför måste de alltid arbeta under tystnad, på ett avslappnat och ostressat sätt, med största möjliga sensoriska uppmärksamhet riktad mot det prov som de provsmakar.

Mellan 8 och 12 provsmakare krävs för varje provning, men det är klokt att ha några reservprovsmakare för att täcka eventuell frånvaro.

**▼ M26**8. **PROVNINGSFÖRHÅLLANDEN**8.1. **Presentation av provet**

Det oljeprov som ska analyseras ska presenteras i standardiserade provsmakningsglas som överensstämmer med standarden IOC/T.20/Doc. Nr 5, "Glas för provsmakning olja".

Glaset ska innehålla 14-16 ml olja, eller mellan 12,8 och 14,6 g om provena ska vägas, och det ska vara täckt med ett urglas.

Varje glas ska märkas med en kod bestående av siffror eller en kombination av bokstäver och siffror som slumpmässigt valts ut. Koden kommer att märkas med hjälp av ett luktlöst system.

8.2. **Provtagnings temperatur och oljeprovets temperatur**

Oljeprover för provsmakning ska förvaras i glas vid  $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  under hela provningen. Denna temperatur har valts eftersom den gör det lättare att följa organoleptiska skillnader än vid rumstemperatur och eftersom de aromatiska föreningar som är typiska för dessa oljor förångas dåligt vid lägre temperaturer, medan högre temperaturer leder till att det bildas flyktiga föreningar som är typiska för uppvärmda oljor. Se standard IOC/T.20/Doc. nr 5 "Glas för provsmakning av olja" för den metod som måste användas för uppvärmning av proven i glas.

**▼ M26**

Provningsrummet måste ha en temperatur på mellan 20 ° och 25 °C (se IOC/T.20/Doc. nr 6).

**8.3. Provningsstid**

Morgonen är bästa tiden provsmakning oljor. Det har bevisats att det finns optimala perioder under dagen när det gäller perceptionen av smak och lukt. Måltider föregås av en period under vilken den olfaktoriska-gustatoriska känsligheten ökar, medan perceptionen därefter minskar.

Detta kriterium bör dock inte överdrivas så att hunger distraherar provsmakarna och därmed minskar deras förmåga till urskiljning. Därför rekommenderas att provsmakningssessionerna hålls mellan 10.00 på morgonen och 12 på dagen.

**8.4. Provsamakare: allmänna förhållningsregler**

Följande rekommendationer gäller för provsmakarnas uppförande under arbetet.

När panelledaren kallar provsmakarna till att delta i en organoleptisk provning bör de kunna delta vid den i förväg fastställda tidpunkten och de ska iaktta följande:

- De får inte röka eller dricka kaffe minst 30 minuter före den tidpunkt som är fastställd för provningen.
- De får inte ha använt några dofter, någon kosmetika eller någon tvål vars lukt kan dröja sig kvar till tidpunkten för provningen. De måste använda en oparfymerad tvål för att tvätta händerna, som ska skölja och torka så ofta som är nödvändigt för att eliminera alla lukter.
- De ska fasta i minst en timme innan provsmakningen genomförs.
- Om de känner sig fysiskt opassliga, och i synnerhet om deras lukt- eller smaksinne är påverkat, eller om de är under någon psykologisk verkan som hindrar dem från att koncentrera sig på sitt arbete, ska provsmakarna avstå från att provsmaka och ska vederbörligen underätta panelledaren.
- När de har uppfyllt ovanstående ska de provsmakarna tyst och under ordnade former inta sin plats i det bås som de tilldelats.
- De ska noggrant läsa anvisningarna på profilformuläret och inte börja undersöka provet förrän de är fullständigt förberedda på de uppgifter de ska utföra (avslappnade och ostressade). Vid eventuell tvivel ska de rådfråga panelledaren i enrum.
- De måste vara tysta när de utför sina uppgifter.
- De måste hela tiden ha sina mobiltelefoner avstängda för att inte inkräkta på sina kollegors koncentration och arbete.

**9. FÖRFARANDE FÖR ORGANOLEPTISK BEDÖMNING OCH KLASIFICERING AV JUNGFRUOLJA****9.1. Provsamakningsteknik****▼ M29**

- 9.1.1 Provsamakaren ska ta upp glaset och hålla det täckt med urglaset, luta det försiktigt och sedan rotera glaset i detta läge för att väta insidan så mycket som möjligt. När denna fas är genomförd ska provsmakaren ta bort urglaset och lukta på provet med djupa, långsamma andetag för att bedöma oljan. Luktandet får inte pågå under mer än 30 sekunder. Om ingen slutsats dras under den tiden ska de ta en kort paus innan de försöker igen.

▼ **M29**

När det olfaktoriska provet har utförts ska provsmakarna bedöma förnimmelserna som framkallas i gommen (totala, retronasala, gustatoriska och taktila förnimmelser). För att göra detta ska de ta en liten klunk på ca 3 ml olja. Det är mycket viktigt att fördela oljan över hela munhålan från främre delen av munnen och tungan längs sidorna till bakre delen och gomfästet, eftersom det är ett känt faktum att uppfattningen av smaker och taktila förnimmelser varierar i intensitet beroende på området på tungan och gommen.

Det bör särskilt påpekas att det är viktigt att en tillräcklig mängd olja sprids mycket sakta över bakre delen av tungan mot strupen medan provsmakaren koncentrerar sig på i vilken ordning de bittra och skarpa upplevelsorna förnims. Om inte detta sker kan båda dessa upplevelser missas i en del oljor eller också kan upplevelsen av den bittra smaken döljas av den skarpa.

Genom att ta korta, upprepade andetag och dra in luften genom munnen kan provsmakaren inte bara sprida provet ordentligt över hela munhålan utan också uppleva de flyktiga, aromatiska komponenterna via näsans bakre gångar.

*Obs!* Om provsmakarna inte förnimmer någon fruktighet i ett prov och intensiteten i den negativa egenskapen uppfattas som 3,5 eller lägre får panelen besluta att det ska göras en ny bedömning av provet vid rumstemperatur (COI/T.20/Doc. No 6/Rev. 1, September 2007, section 3 – *General specifications for installation of a test room*), varvid det ska anges i vilket sammanhang den nya bedömningen görs och definieras vad som avses med rumstemperatur. När provet har uppnått rumstemperatur ska provsmakarna göra en ny bedömning av förnimmelserna av fruktighet. Om de förnimmer fruktighet ska den anges på skalan.

Den taktila förnimmelserna av skarphet bör beaktas. Därför är det lämpligt att svälja oljan.

▼ **M26**

- 9.1.2. När en jungfruolja ska bedömas organoleptiskt rekommenderas att högst FYRA PROV utvärderas vid samma tillfälle och att högst tre provnings-sessioner genomförs per dag, för att undvika de kontraster som kan uppstå vid en omedelbar provning av andra prover.

Eftersom efterföljande provningar skapar trötthet eller brist på känslighet är det viktigt att använda en produkt som kan ta bort resterna av oljan i munnen från den föregående provningen.

Användning av en liten bit äpple rekommenderas, som efter tuggning kan spottas ut i spottkoppen. Sedan sköljs munnen med litet vatten vid rumstemperatur. Minst 15 minuter ska gå mellan slutet av en provning och början av nästa.

9.2. **Provsamakarnas användande av profilformuläret.**

Det profilformulär som är avsett att användas av provsmakarna redovisas närmare i figur 1 i denna bilaga.

Varje provsmakare i panelen ska först lukta på och därefter provsmaka <sup>(1)</sup> den berörda oljan. De ska sedan ange med vilken intensitet som de uppfattar var och en av de negativa och positiva egenskaperna på 10 cm-skalan i det profilformulär som tillhandahålls.

<sup>(1)</sup> De får avstå från att provsmaka en olja om de noterar någon extremt negativ och direkt olfaktorisk förnimmelbar egenskap och ska då anteckna detta exceptionella förhållande i profilformuläret.

**▼ M26**

Om provsmakaren upplever negativa egenskaper som inte återfinns i avsnitt 4 ska de anteckna dessa under rubriken "övrigt" och använda det eller de begrepp som bäst beskriver dessa egenskaper.

**▼ M28****9.3. Panelledarnas användning av data**

Panelledarna ska samla in de profilformulär som fyllts i av varje provsmakare och kontrollera de intensiteter som angivits för de olika egenskaperna. Om panelledarna påträffar någon avvikelse ska de uppmana provsmakaren att se över sitt profilformulär, och vid behov upprepa provet.

Panelledaren ska föra in varje panelmedlems bedömningsdata i ett datorprogram som motsvarar standarden IOC/T.20/Doc. nr 15 för statistisk beräkning av resultaten av analysen, på grundval av en beräkning av deras medianvärde. Se avsnitt 9.4 och tillägget till denna bilaga. Uppgifterna för ett visst prov ska registreras med hjälp av en matris som består av nio kolumner vilka motsvarar nio sensoriska egenskaper och av n rader som motsvarar de n panelmedlemmar som använts.

När en defekt uppfattas och förs in under rubriken "övrigt" av minst 50 % av panelen ska panelledaren beräkna medianvärdet för defekten för att få fram motsvarande klassificering.

Värdet av den robusta variationskoefficient som definierar klassificeringen (defekt med största intensitet och fruktig egenskap) får inte överstiga 20 %.

I annat fall måste panelledaren göra om bedömningen av detta specifika prov vid ett annat provsmakningstillfälle.

Om denna situation uppkommer ofta rekommenderas panelledaren att ge provsmakarna särskild kompletterande utbildning (IOC/T.20/Doc. nr 14, § 5) och att använda repeterbarhetsindex och avvikelseindex för att kontrollera panelens resultat (IOC/T.20/Doc. nr 14, § 6).

**▼ M29****9.4 Klassificering av oljan**

Oljan ska klassificeras enligt följande kategorier, med defekternas medianvärde och fruktighetens medianvärde som utgångspunkt. Defekternas medianvärde definieras som medianvärdet för den defekt som upplevs mest intensivt. Defekternas medianvärde och medianvärdet för egenskapen fruktighet anges med en decimal.

Klassificeringen av oljan sker genom att defekternas medianvärde och medianvärdet för egenskapen fruktighet jämförs med de referensintervall som anges nedan. Då gränsvärdena för dessa intervall har fastställts med beaktande av metodens felmarginal anses de vara absoluta. Genom programvaran kan klassificeringen visas grafiskt eller i en tabell med statistiska uppgifter.

- a) Extrajungfruolja: defekternas medianvärde är lika med 0 och medianvärdet för egenskapen fruktighet är större än 0.
- b) Jungfruolja: defekternas medianvärde är större än 0 men inte större än 3,5 och medianvärdet för egenskapen fruktighet är större än 0.
- c) Bomolja: defekternas medianvärde är större än 3,5 eller defektens medianvärde är 3,5 eller mindre och medianvärdet för fruktighet är 0.

▼ **M29**

*Anmärkning 1:* När medianvärdet för egenskapen bitter och/eller skarp är större än 5,0 ska panelledaren ange detta på provningsintyget.

För bedömningar som syftar till att kontrollera överensstämmelse ska en provning utföras. Vid kontrollbedömningar, ska bedömningen utföras dubbelt i olika sessioner. Analysresultaten från kontrollbedömningen ska vara statistiskt homogena. (Se punkt 9.5) Om inte måste två nya kontrollbedömningar göras. Det slutgiltiga medianvärdet för klassificeringsegenskaperna ska beräknas som ett medelvärde av båda medianerna.

### 9.5 Kriterier för godkännande och avvisande av dubbelprov

Det normaliserade felvärdet enligt definitionen nedan ska användas för att avgöra om resultaten från de båda kontrollbedömningarna är homogena eller statistiskt godtagbara.

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

Om  $Me_1$  och  $Me_2$  är medianvärdena för de båda kontrollbedömningarna (den första respektive den andra kontrollbedömningen) och  $U_1$  och  $U_2$  är värdena för den utvidgade mätosäkerheten, beräknade enligt följande enligt specifikationerna nedan, gäller följande:

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

För den utvidgade mätosäkerheten gäller att  $c = 1,96$ , varför

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

där  $CV_r$  är den robusta variationskoefficienten.

För att de två erhållna värdena ska kunna anses som statistiskt homogena måste  $E_n$  vara lika med 1,0 eller lägre.

▼ **M26***Tillägg***Metod för beräkning av medianvärde och konfidensintervall****Medianvärde**

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

Medianen definieras som det reella talet  $X_m$  som kännetecknas av att sannolikheten ( $p$ ) att värdena inom fördelningen ( $X$ ) är lägre än talet ( $X_m$ ), är mindre än eller lika med 0,5, samtidigt som sannolikheten ( $p$ ) att värdena inom fördelningen ( $X$ ) är mindre än eller lika med  $X_m$  är större än eller lika med 0,5. En mer praktisk definition är att medianvärdet är den 50:e percentilen av en uppsättning tal som ordnats i stigande ordning. Enkelt uttryckt är det mittpunkten i en ordnad serie om antalet tal är ojämnt, eller medelvärdet av de två mittpunkterna i en ordnad serie om antalet tal är jämnt.

**Robust standardavvikelse**

För att få en tillförlitlig uppskattning av spridningen kring medianen används Stuarts och Kendalls metod för uppskattning av robust standardavvikelse (4). Med följande formel beräknas den robusta asymptotiska standardavvikelsen, dvs. den robusta uppskattningen av spridningen hos uppgifterna i fråga, varvid  $N$  är antalet observationer och IQR är kvartilavståndet, som omfattar exakt 50 % av elementen i en given sannolikhetsfördelning.

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

Kvartilavståndet beräknas genom beräkning av skillnaden mellan den 75:e och den 25:e percentilen.

$$\text{IQR} = 75 : \text{epercentilen} - 25 : \text{epercentilen}$$

Om percentilen är värdet  $X_m$ , som kännetecknas av att sannolikheten ( $p$ ) att värdena inom fördelningen är lägre än  $X_{pc}$  är mindre än eller lika med ett specifikt hundradelsvärde, samtidigt som sannolikheten ( $p$ ) att värdena inom fördelningen är mindre än eller lika med  $X_{pc}$  är större än eller lika med detta specifika hundradelsvärde. Hundradelsvärdet anger vilken fraktil det rör sig om. När det gäller medianen är detta värde lika med 50/100.

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

Percentilen är i praktiken det värde i fördelningen som motsvarar ett givet område som avgränsas av fördelningskurvan eller frekvenskurvan. Den 25:e percentilen utgör exempelvis det värde i fördelningen som motsvarar ett område lika med 0,25 eller 25/100.

I denna metod beräknas percentilen på grundval av de verkliga värden som förekommer i datamatrixen (beräkningsmetod för percentiler).

**Robust variationskoefficient (%)**

$CV_r\%$  motsvarar ett rent tal som utgör ett mått på den analyserade talseriens spridning. Denna koefficient är därför mycket användbar som ett mått på panelmedlemmarnas tillförlitlighet.

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



**▼ M26****Konfidensintervall på 95 % kring medianvärdet**

Konfidensintervall (KI) på 95 % (risken för fel av första slaget uppgår till 0,05 eller 5 %) utgör det intervall inom vilket medianvärdet skulle kunna variera, om det vore möjligt att upprepa försöket ett oändligt antal gånger. I praktiken anger konfidensintervallet hur stor försökets variabilitet är under rådande förhållanden, om man antar att försöket kan upprepas ett flertal gånger. I likhet med  $CVr\%$  ger konfidensintervallet ett mått på hur tillförlitligt försöket är.

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

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

där  $C = 1,96$  för konfidensintervall på 95 %.

Ett exempel på beräkningsbladet finns i bilaga I till standard IOC/T 20/Doc. No 15.

*Referenser*

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

**▼ M20**

\_\_\_\_\_

**▼ M19**

\_\_\_\_\_

**▼B***BILAGA XV*

## 1. OLJEHALT I PRESSRESTER AV OLIVER

## 1.1 Utrustning

- lämpligt extraktionsapparat som är utrustad med en 200 till 250 ml rundkolv,
- elektriskt uppvärmt bad (t.ex. sandbad, vattenbad) och värmeplatta,
- analysvåg,
- värmeskåp som kan ställas in på max 80 °C,
- elektriskt uppvärmt värmeskåp som är utrustat med en termostatanordning som skall ställas in på  $103 \pm 2$  °C och som kan tåla en genomströmning av luft eller som kan arbeta under minskat tryck,
- mekanisk kvarn som är lätt att rengöra och som tillåter att olivrester kan malas utan temperaturförhöjning eller någon förändring i deras fuktighetsinnehåll, flyktiga ämnen eller ämnen som går att extrahera med hexan,
- extraktionsskål och bomull eller filterpapper varifrån ämnen som är extraherbara med hexan redan har blivit borttagna,
- exsickator,
- sil med hål av 1 mm diameter,
- små partiklar av förtorkad pimpsten.

## 1.2 Reagenser

N-hexan, teknisk kvalitet som inte får lämna större återstod än 0,002 g/100 ml vid total förångning.

## 2. UTFÖRANDE

## 2.1 Preparering av provet

Om så behövs används den mekaniska kvarnen, som skall vara väl regjord till malning av laboratorieprovet för att minska partikelstorleken så att provet kan passera silen helt och hållet.

Använd ungefär en tjugondel av provet för att fullfölja rengöringen av kvarnen, kasta det malda materialet, mal resten och samla upp, blanda omsorgsfullt och analysera utan dröjsmål.

## 2.2 Provmängd

Så fort malningen är färdig, väg upp ca 10 g av provet på 0,01 g när, för undersökning.

## 2.3 Preparering av extraktionsskålen

Placera provet i skålen och täck över med bomull. Om filterpapper används, slå in provet i detta.

## 2.4 Förtorkning

Om olivresterna är mycket fuktiga (dvs innehåller fukt och flyktiga ämnen till större andel än 10 %) genomförs förtorkning genom att den fyllda filter-skålen (eller filterpappret) placeras i ett värmeskåp under en lämplig tid vid högst 80 °C för att minska fukthalten och halten av flyktiga ämnen så att de understiger 10 %.

**▼B****2.5 Preparering av rundkolven**

Väg på 1 mg när kolven som innehåller en eller två bitar pimpsten, som tidigare torkats i värmeskåp vid  $103 \pm 2$  °C och sedan svalnat i en exsiccator i minst en timme.

**2.6 Första extraktionen**

Sätt in extraktionsskålen (eller filtrerpappret) som innehåller provet i apparaten. Håll en tillräcklig mängd hexan i kolven. Sätt fast kolven på extraktionsapparaten och placera den sedan på ett elektriskt uppvärmt bad. Justera uppvärmningen på så sätt att återflödes hastigheten inte är mindre än tre droppar per sekund (lugn, inte våldsamt kokning).

Efter fyra timmars extraktion får apparaten svalna. Ta bort extraktionsskålen från extraktionsapparaten och placera den i ett luftrum för att ta bort återstoden av lösningsmedlet.

**2.7 Andra extraktionen**

Håll innehållet i extraktionsskålen i mikrokvarnen och mal så fint som möjligt. Överför den malda blandningen till skålen kvantitativt och sätt den sedan tillbaka i extraktionsapparaten.

Fortsätt extraktionen under ytterligare två timmar med användning av samma rundkolv som innehåller extraktet från första extraktionen.

Lösningen i extraktionskolven måste vara klar. Om det inte är det, filtrera genom ett filtrerpapper och tvätta den ursprungliga kolven och filtrerpappret flera gånger med hexan. Samla upp filtratet och tvättlösningen i en ny rundkolv som har torkats och vägts på 1 mg när.

**2.8 Borttagning av lösningsmedel och vägning av extraktet**

Ta bort större delen av lösningsmedlet genom destillation på ett elektriskt uppvärmt bad. Ta bort de sista resterna av lösningsmedlet genom att upphetta kolven i ett värmeskåp till  $103 \pm 2$  °C i 20 minuter. Påskynda processen antingen genom att blåsa in luft eller företrädesvis en inert gas i intervaller eller använd undertryck.

Låt kolven kallna i en exsiccator i minst en timme och väg på 1 mg när.

Upphetta igen 10 minuter under samma förhållanden, låt svalna i exsiccator och väg igen.

Skillnaden mellan vägningarna får inte överstiga 10 mg. Om den gör det, upprepa upphettningen i 10 minuters perioder följt av avkylning och vägning tills viktskillnaden är 10 mg eller mindre. Anteckna den sista vägningen av kolven.

Genomför dubbelprov på provet.

**3. RESULTATANGIVELSE****3.1 Metod för beräkning och formel**

a) Extraktet uttryckt som massprocent av provet som erhållits är lika med:

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

**▼ B**

där:  $S$  = massprocenten av extraktet från produkten,

$m_0$  = massan i gram av provet,

$m_1$  = massan i gram av extraktet efter torkning.

Som resultat tas det aritmetiska medelvärdet av dubbelproven under förutsättning att repeterbara förhållanden har uppnåtts.

Uttryck resultaten med en decimal.

b) Extraktet uttrycks som torrsubstans genom formeln:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{oljeprocenten i extraktet beräknat som torrsubstans}$$

där:  $S$  = procenten av extraktet från provet som erhållits [se a)].

$U$  = innehållet av fukt och flyktiga ämen.

**3.2 Repeterbarhet**

Skillnaden mellan dubbelproven som utförts samtidigt eller i snabb följd av samma analytiker skall inte överstiga 0,2 g hexanextrakt per 100 g prov.

Om detta förhållande inte är uppfyllt upprepas analysen på två andra prover. Om det även i det här fallet uppstår en skillnad som överstiger 0,2 g tas resultatet genom att medelvärdet av de fyra bestämningarna tas.

**▼B***BILAGA XVI***BESTÄMNING AV JODTAL**

## 1. SYFTE

Denna internationella standard specificerar en metod för bestämning av jodtal hos animaliska och vegetabiliska fetter och oljor som nedan kallas fetter.

## 2. DEFINITION

I denna internationella standard används följande beteckningar:

- 2.1 *Jodtal*: Massan av jod som absorberas av provet under de driftförhållanden som anges i denna internationella standard.

Jodtalet uttrycks som gram jod per 100 g prov.

## 3. PRINCIP

Upplösning av ett prov i lösningsmedel och tillsats av Wijs reagens. Efter en angiven tid tillsats av kaliumjodidlösning och vatten, titrering av den frigjorda joden med natriumtiosulfat.

## 4. REAGENSER

Alla reagenser skall vara av analyskvalitet.

- 4.1 *Kaliumjodid*, 100 g/l lösning, som inte innehåller jodat eller fri jod.

- 4.2 *Stärkelse*, lösning.

Lös 5 g vattenlöslig stärkelse i 30 ml vatten, tillsätt denna blandning till 1 000 ml kokande vatten, koka i tre minuter och låt svalna.

- 4.3 *Natriumtiosulfat*, ställd standardlösning  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$ , som ställts högst sju dagar före användning.

- 4.4 *Lösningsmedel*, erhållet genom blandning av lika volymer av cyklohexan och ättiksyra.

- 4.5 *Wijs reagens*, som innehåller jodmonoklorid i ättiksyra. Den Wijs reagens som finns i handeln skall användas.

*Anm*: Reagensen innehåller 9 g  $\text{ICl}_3$  och 9 g I i ättiksyra.

## 5. UTRUSTNING

Vanlig laboratorieutrustning och särskilt följande:

- 5.1 *Väggglas* som är lämpliga för provet och för att kunna sättas in i kolvarna (5.2).

- 5.2 *E-kolvar*, 500 ml, utrustade med slipade glasproppar och helt torra.

## 6. PREPARERING AV PROVET

Det homogeniserade provet torkas över natriumsulfat och filtreras.

## 7. UTFÖRANDE

## 7.1 Prov

Mängden av det prov som tas ut varierar enligt det förväntade jodtalet enligt tabell 1.

**▼B**

Tabell 1

Förväntat jodtal	Mängd prov (gram)
mindre än 5	3,00
5 till 20	1,00
21 till 50	0,40
51 till 100	0,20
101 till 150	0,13
151 till 200	0,10

Väg provet på 0,1 mg när i ett vägglas (5.1).

## 7.2. Bestämning

Placera provet i en 500 ml kolv (5.2). Tillsätt 20 ml av lösningsmedlet (4.5) för att lösa fett. Tillsätt exakt 25 ml av Wijs reagens (4.6), sätt i proppen, skaka om innehållet och placera kolven i mörker. Använd inte en vanlig munpipett för Wijs reagens.

Gör i ordning ett blindprov på samma sätt med lösningsmedlet och reagen- sen men utan prov.

För prov som har ett jodtal under 150 får kolven stå i mörker i en timma, för de som har ett jodtal över 150 och för polymeriserade produkter eller produkter som har oxiderats påtagligt får stå i två timmar.

När denna tid gått ut tillsätt 20 ml kaliumjodidlösning (4.2) och 150 ml vatten (4.1) till var och en av kolvarna.

Titra med den ställda natriumtiosulfatlösningen (4.4) tills den gula färgen av joden nästan har försvunnit. Tillsätt ett par droppar av stärkelselösningen (4.3) och fortsätt titreringen tills den blå färgen försvinner efter omsorgsfull skakning.

*Ann:* Potentiometrisk bestämning av slutpunkten är tillåten.

## 7.3. Antal bestämningar

Genomför två bestämningar på samma prov.

## 8. RESULTATANGIVELSE

Jodtalet erhålles genom uttrycket

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

där:

c = det numeriska värdet av den exakta koncentrationen i mol per liter av den ställda natriumtiosulfatlösningen (4.4) som används;

V<sub>1</sub> = det numeriska värdet på volymen i milliliter på den ställda natrium- tiosulfatlösningen (4.4) som används för blindprov;

**▼B**

$V_2$  = det numeriska värdet på volymen i milliliter på den ställda natriumtiosulfatlösningen (4.4) som används vid bestämningen;

$m$  = det numeriska värdet på massan i gram hos provet (7.1).

Som resultat tas det aritmetiska medelvärdet av två bestämningar under förutsättning att kravet för repeterbarhet är uppfyllt.

▼ **M11***BILAGA XVII***METOD FÖR BESTÄMNING AV STIGMASTADIENER I VEGETABILISKA OLVJOR**

## 1. SYFTE

Bestämning av stigmastadiener i vegetabiliska oljor som innehåller låga halter av dessa kolväten, särskilt jungfruolivolja och rå olivolja av pressrester.

## 2. TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Metoden kan användas för alla vegetabiliska oljor även om mätningarna endast är tillförlitliga när halten av dessa kolväten är mellan 0,01 och 4,0 mg/kg. Metoden är särskilt lämpad för att påvisa förekomst av raffinerade vegetabiliska oljor (oliv, olivpressrester, solros, palm etc.) i jungfruolivolja eftersom raffinerade oljor innehåller stigmastadiener medan jungfruolivolja inte gör det.

## 3. PRINCIP

Separering av oförtvålbare ämnen. Separering av den steroida kolvätefraktionen genom kolonnkromatografi på kiselgel och analys med kapillär-gaskromatografi.

## 4. UTRUSTNING

4.1 250 ml lämpliga kolvar med återflödeskylare.

4.2 Separertrattar 500 ml.

4.3 Rundkolvar 100 ml.

4.4 Rotationsindunstare.

4.5 Kromatografikolonn av glas (innerdiameter: 1,5—2,0 cm, längd: 50 cm) med teflonpropp och en tuss glasull eller en sinterglasskiva i botten. För beredning av kiselgelkolonnen, häll hexan på kromatografikolonnen till ett djup av ca 5 cm och fyll därefter på med en lösning av kiselgel i hexan (15 g i 40 ml) med hjälp av små portioner hexan. Låt stå och avsluta med en lätt omskakning. Tillsätt vattenfritt natriumsulfat till en höjd av cirka 0,5 cm och eluera slutligen överflödigt hexan.

4.6 Gaskromatograf med flamjoniseringsdetektor, separat injektor eller injektor som är kallintegrerad i kolonnen och en ugn som kan programmeras med en noggrannhet av  $\pm 1$  °C.

4.7 Kapillärkolonn av kvarts för gaskromatografi (innerdiameter: 0,25 eller 0,32 mm, längd: 25 m) täckta med 5 % fenylmetylsilikonfas med en filmtjocklek av 0,25  $\mu\text{m}$ .

*Anm. 1:*

Andra kolonner av samma eller lägre polaritet kan användas.

4.8 Integrerad registreringsenhet som ger möjlighet till integrering över varje enskild topp.

4.9 5—10  $\mu\text{l}$  mikrospruta för gaskromatografi med härdad nål.

4.10 Eluppvärmd mantel eller uppvärmningsplatta.



**▼ M11**

## 5. REAGENSER

Alla reagenser skall vara av analytisk renhet om inte annat anges. Det vatten som används skall vara destillerat vatten eller vatten av minst motsvarande renhetsgrad.

- 5.1 Hexan eller blandning av alkaner med ett kokpunktsintervall på 65—70 °C, destillerat med rektifieringskolonn.

*Anm. 2:*

Lösningen skall destilleras för att avlägsna orenheter.

- 5.2 96 % etanol (volymprocent).

- 5.3 Vattenfritt natriumsulfat.

- 5.4 10-procentig alkoholkaliumhydroxidlösning. Tillsätt 10 ml vatten till 50 g kaliumhydroxid, rör om och lös därefter upp blandningen i etanol till 500 ml.

*Anm. 3:*

Alkoholkaliumhydroxid blir brun när den får stå. Den bör göras i ordning varje dag och förvaras i väl tillslutna mörka glasflaskor.

- 5.5 Kiselgel 60 för kolonnkromatografi, 70—230 mesh (Merck ref. 7734 eller liknande).

*Anm. 4:*

Kiselgel kan normalt användas direkt från behållaren utan föregående behandling. Vissa partier kisel kan emellertid uppvisa låg aktivitet vilket ger dåliga kromatografiska separeringar. I sådana fall bör kiselgelen behandlas på följande sätt: Aktivera kiselgelen genom uppvärmning under minst fyra timmar vid 550 °C. Efter uppvärmningen placeras kiselgelen i en exsickator där den får svalna och förs därefter över till en kolv med tillslutningsanordning. Tillsätt 2 % vatten och skaka om tills inga klumpar längre kan ses och pulvret flyter fritt.

Om partier av kiselgel ger kromatogram med interfererande toppar bör kiselgelen behandlas på det sätt som beskrivs ovan. Alternativt kan extra ren kiselgel 60 (Merck ref. 7754) användas.

- 5.6 Stamlösning (200 ppm) av kolesta-3,5-dien (Sigma, 99 % renhet) i hexan (10 mg i 50 ml).

- 5.7 Standardlösning av kolesta-3,5-dien i hexan med en koncentration av 20 ppm erhållen genom utspädning av ovanstående lösning.

*Anm. 5:*

Om de lösningar som avses i 5.6 och 5.7 förvaras under 4 °C så kommer de inte att förfaras under åtminstone de första fyra månaderna.

- 5.8 Lösning av n-nonacosan i hexan med en koncentration av cirka 100 ppm.

- 5.9 Bärargas för kromatografi: helium eller väte med en renhetsgrad på 99,9990 %.

- 5.10 Hjälpgaser för flamjoniseringsdetektor: väte med en renhetsgrad på 99,9990 % och ren luft.

**▼ M11****6. UTFÖRANDE****6.1 Preparering av oförtvålbare ämnen**

- 6.1.1 Väg  $20 \pm 0,1$  g olja i en 250 ml kolv (4.1), tillsätt 1 ml standardlösning av kolesta-3,5-dien ( $20\mu\text{g}$ ) och 75 ml 10-procentig alkoholkaliumhydroxid, sätt på återflödeskylare och värm upp till sakta kokning i 30 minuter. Ta bort kolven som innehåller provet från värmen och låt lösningen svalna något (låt den inte kallna helt eftersom provet då tjocknar). Tillsätt 100 ml vatten och överför lösningen till en separertratt (4.2) genom att använda 100 ml hexan. Omskaka blandningen kraftigt i 30 sekunder och lämna sedan att separera.

*Anm. 6:*

Om en emulsion produceras och inte snabbt försvinner tillsätt små mängder av etanol.

- 6.1.2 Överför den undre vattenfasen till en annan separertratt och gör ytterligare en extraktion med användning av 100 ml hexan. Häll ur den undre fasen en gång till och tvätta hexanextrakten (samlade i en annan separertratt) tre gånger med 100 ml var gång med en blandning av etanol och vatten (1:1) tills neutralt pH-värde uppnås.
- 6.1.3 Låt hexanlösningen flyta genom vattenfritt natriumsulfat (50 g), tvätta med 20 ml hexan och indunsta i en rotationsindunstare vid  $30\text{ }^\circ\text{C}$  och under lätt tryck till torrhet.

**6.2 Separering av den steroida kolvätefraktionen**

- 6.2.1 Överför återstoden till fraktioneringskolonnen med användning av två 1 ml portioner hexan, häll provet på kolonnen genom att låta lösningens nivå sjunka till toppen av natriumsulfatet och börja kromografisk eluering med hexan med en hastighet av ca 1 ml/minut. Häll bort de första 25—30 ml av elueringen och samla in den följande 40 ml fraktionen. Efter uppsamlingen överför denna fraktion till en 100 ml rundbottnad cylinder (4.3).

*Anm. 7:*

Den första fraktionen innehåller mättade kolväten (fig. 1a) och den andra fraktionen de steroida kolvätena. Ytterligare eluering ger skvalen och relaterade föreningar. För att uppnå en god separering mellan mättade och steroida kolväten, krävs en optimering av fraktionernas volymer. I detta syfte bör den första fraktionens volym justeras så att de toppar som representerar mättade kolväten är låga när den andra fraktionen analyseras (se fig. 1c). Om de inte formas, utan standardtoppens intensitet är låg, bör volymen minskas. En fullständig separering mellan den första och den andra fraktionens komponenter är hur som helst inte nödvändig eftersom det inte förekommer någon överlappning av topparna under analysen med gaskromatografi om gaskromatografiska villkor ändras i enlighet med 6.3.1. En optimering av den andra fraktionens volym är i allmänhet inte nödvändig eftersom en god separering erhålls med de följande komponenterna. En hög topp med omkring 1,5 minuter kortare retentionstid är standarden beror emellertid på skvalen och är ett tecken på en dålig separering.

- 6.2.2 Indunsta den andra fraktionen i en indunstare vid  $30\text{ }^\circ\text{C}$  och under lätt tryck till torrhet och lös omedelbart upp återstoden i 0,2 ml hexan. Förvara lösningen i kylskåp fram till analysen.

*Anm. 8:*

De återstoder som anges i 6.1.3 och 6.2.2 bör inte förvaras torrt eller i rumstemperatur. Så snart de har erhållits, bör lösningsmedel tillsättas och lösningarna bör förvaras i kylskåp.

▼ **M11****6.3 Gaskromatografi**

## 6.3.1 Driftförhållanden för separerad injektion:

- Injektorns temperatur: 300 °C.
- Detektorns temperatur: 320 °C.
- Integrerad registreringsenhet: parametrarna för integrering bör ställas in så att en korrekt uppskattning av ytorna erhålls. Integration över de enskilda topparna rekommenderas.
- Känslighet: omkring 16 gånger högre än minimikänsligheten.
- Kvantitet av det injicerade ämnet: 1 µl.
- Inställning av ugnstemperaturen: starttemperaturen skall vara 235 °C i 6 minuter, därefter ökas temperaturen med 2 °C/min upp till 285 °C.
- Injektor med delningsförhållandet 1: 15.
- Bärargas: helium eller väte vid ett tryck av ungefär 120 kPa.

Dessa förhållande kan ändras i enlighet med kromatograf- och kolonnkarakteristiken för att erhålla kromatogram som uppfyller följande krav: intern standardtopp inom ca 5 minuter av den tid som anges i 6.3.2. Den interna standardtoppen bör vara minst 80 % av hela skalvärdet.

Det gaskromatografiska systemet måste kontrolleras genom att en blandning av stamlösningen av kolestadien (5.6) och n-nonacosanlösning (5.8) sprutas in. Kolesta-3,5-dientoppen måste formas n-nonacosanet (fig. 1c). Om den inte framträder kan två åtgärder vidtas: att sänka ugnstemperaturen eller att använda kolonner som inte är lika polära.

## 6.3.2 Identifiering av toppar

Den inre standardtoppen formas vid omkring 19 minuter och stigmasta-3,5-dien med en relativ retentionstid på cirka 1,29 (se fig. 1b). Med stigmasta-3,5-dien förekommer små mängder av en isomer och vanligtvis formar de båda en enda kromatografisk topp. Om kolonnen är för polär eller uppvisar för stor upplösningsförmåga, kan isomeren emellertid framträda som en liten topp före och mycket nära stigmasta-3,5-dientoppen (fig. 2). För att försäkra sig om att stigmastadienerna elueras till en topp är det tillrådligt att ersätta kolonnen med en kolonn som inte är lika polär eller en kolonn med större innerdiameter.

*Anm. 9:*

Stigmastadiener för kromatografisk referens kan erhållas genom analys av en raffinerad vegetabilisk olja med användning av en mindre provmängd (1–2 g). Stigmastadiener producerar en mycket tydlig och lätt identifierbar topp.

## 6.3.3 Kvantitativ analys

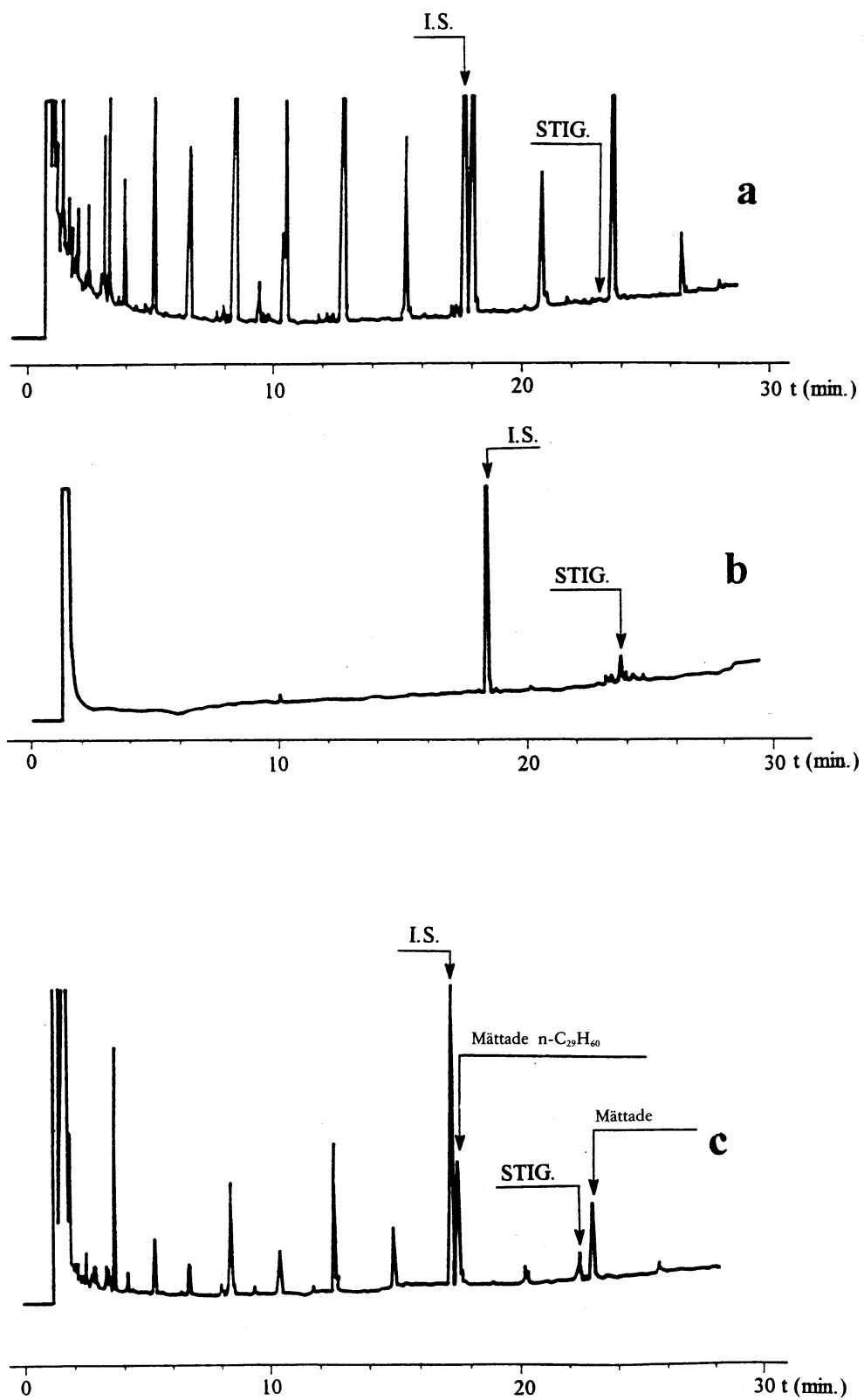
Stigmastadienhalten bestäms enligt formeln

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

**▼ M11**

- där:
- $A_s$  = arean av stigmastadientoppen (om toppen upplöses i två isomer, summan av de två topparnas areor)
  - $A_c$  = arean av inre standard (kolestadien)
  - $M_c$  = massan av tillsatt standard i mikrogram
  - $M_o$  = massan av oljan som tagits ut för undersökning i gram

Gräns för påvisbarhet: ca 0,01 mg/kg.

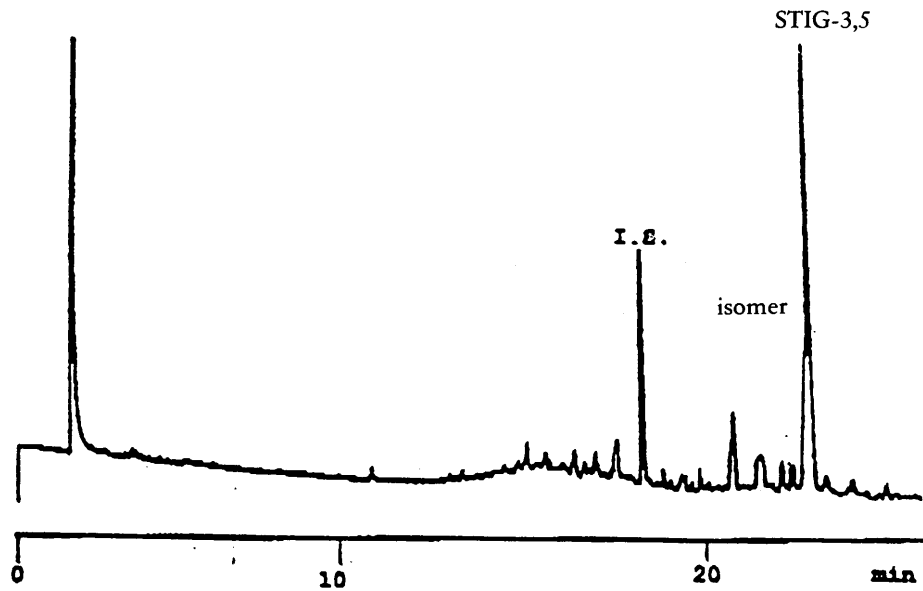
▼ M11

Figur 1

Gaskromatogram erhållna genom analys av prover av olivolja på en kapillärkolonn av kvarts (0,25 mm innerdiameter på en längd av 25 m) täckt med 5-procentig fenylmetylsilikon med en filmtjocklek av 0,25  $\mu\text{m}$ .

▼ **M11**

- a) Första fraktionen (30 ml) från en jungfruolja med tillsatt standard.
- b) Andra fraktionen (40 ml) från en olivolja innehållande 0,10 mg stigmastadien per kg.
- c) Andra fraktionen (40 ml) innehållande en liten del av den första fraktionen.

**Figur 2**

Gaskromatogram som erhållits från ett prov av raffinerad olivolja analyserad på en DB-5 kolonn och som visar stigmasta-3,5-diens isomer.

▼ **M25***BILAGA XVIII***BESTÄMNING AV SKILLNADEN MELLAN FAKTISKT OCH TEORETISKT INNEHÅLL AV TRIGLYCERIDER MED ECN 42**

## 1. SYFTE

Bestämning av den absoluta skillnaden mellan å ena sidan de experimentella värdena för triglycerider med ekvivalent koltal 42 (equivalent carbon number, ECN<sub>42</sub><sup>HPLC</sup>) erhållna genom att oljan analyseras med vätskekromatografi (HPLC) och å andra sidan de teoretiska värdena för triglycerider med ekvivalent koltal 42 (ECN 42<sup>theoretical</sup>) beräknade utifrån fettsyrasammansättning.

## 2. TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Denna standard gäller för olivoljor. Metoden används för att detektera små mängder fröoljor (som är rika på linolsyra) i alla olivoljeklasser.

## 3. PRINCIP

Det genom HPLC-analys fastställda innehållet av triglycerider med ECN 42 och det teoretiska innehållet av triglycerider med ECN 42 (beräknat på grundval av fettsyrasammansättning bestämd genom gaskromatografi) överensstämmer inom vissa gränser för äkta olivoljor. Skillnader som är större än de värden som beslutats för varje typ av olja visar att oljan innehåller fröoljor.

## 4. METOD

Beräkningen av det teoretiska innehållet av triglycerider med ECN 42 och av skillnaden jämfört med HPLC-data görs i huvudsak genom samordning av analysresultat som erhållits med hjälp av andra metoder. Tre faser kan urskiljas: bestämning av fettsyrasammansättningen genom kapillärgaskromatografi, beräkning av den teoretiska sammansättningen av triglycerider med ECN 42 samt HPLC-bestämning av triglycerider med ECN 42.

4.1 **Utrustning**

4.1.1 Rundkolvar, 250 och 500 ml.

4.1.2 Bägare, 100 ml.

4.1.3 Glaskolonn för kromatografi, inre diameter 21 mm, längd 450 mm, med kran och mattslipad övre mynning (hona).

4.1.4 Separertrattar, 250 ml, med mattslipad smal mynning som passar in i kolonnens överdel.

4.1.5 Glasstav, längd 600 mm.

4.1.6 Glatratt, diameter 80 mm.

4.1.7 Mätkolvar, 50 ml.

4.1.8 Mätkolvar, 20 ml.

4.1.9 Rotationsindunstare.

4.1.10 Vätskekromatograf (HPLC) med termostattstyrning av kolonnens temperatur.

4.1.11 Injektorer för provvolym på 10 µl.

4.1.12 Detektor: differentialrefraktometer. Känsligheten över hela skalan bör inte vara sämre än 10<sup>-4</sup> brytningsindexenheter.

**▼ M25**

4.1.13 Kolonn: rör i rostfritt stål, längd 250 mm och innerdiameter 4,5 mm, packad med partiklar av kiseldioxid med en diameter på 5 µm och med 22–23 % kol i form av oktadecylsilan.

4.1.14 Datorprogram.

4.1.15 Provbehållare, ca 2 ml, med teflonsepta och skruvlock.

**4.2 Reagens**

Reagensen ska vara av analytisk renhetsgrad. Elueringslösningarna ska vara avgasade och kan återanvändas flera gånger utan att det inverkar på separeringarna.

4.2.1 Petroleumeter 40–60 °C, av kromatografisk renhet, eller hexan.

4.2.2 Etyleter, peroxidfri, nydestillerad.

4.2.3 Elueringslösning för rening av oljan genom kolonnkromatografi, blandning petroleumeter/etyleter 87/13 (v/v).

4.2.4 Kiselgel, 70–230 mesh, av typen Merck 7734, standardiserad till ett vatteninnehåll på 5 viktprocent.

4.2.5 Glasull.

4.2.6 Aceton för HPLC.

4.2.7 Acetonitril eller propionitril för HPLC.

4.2.8 Elueringslösning för HPLC: acetonitril + aceton (proportionerna justeras så att man får den önskade separeringen, börja med blandning 50:50) eller propionitril.

4.2.9 Lösningsmedel: aceton.

4.2.10 Referenstriglycerider: antingen används kommersiellt tillgängliga triglycerider (tripalmitin, triolein etc.), varvid retentionstiderna ska redovisas i förhållande till ekvivalent koltal, eller också används referenskromatogram från sojaolja, blandning 30:70 sojaolja–olivolja samt ren olivolja (se noterna 1 och 2 samt figurerna 1–4).

4.2.11 Kolonn för fastfasextraktion med kiseldioxid, 1 g, 6 ml.

**4.3 Beredning av prover**

Eftersom interfererande ämnen kan ge upphov till felaktiga positiva resultat måste provet alltid renas i enlighet med IUPAC-metod 2.507 för bestämning av polära ämnen i oxiderade oljor.

**4.3.1 Förberedelse av kromatografikolonn**

Fyll kolonnen (4.1.3) med cirka 30 ml elueringslösning (4.2.3). För ned en propp av glasull (4.2.5) till botten av kolonnen med hjälp av glasstaven (4.1.5).

Slamma upp 25 g kiselgel (4.2.4) i 80 ml elueringsblandning (4.2.3) i en 100 ml glasbägare. För över uppslamningen till kolonnen med hjälp av en glastratt (4.1.6).

För att vara säker på att all kiselgel förts över till kolonnen, skölj glasbägaren med elueringsblandningen och för över sköljvätskan till kolonnen.

Öppna kolonnens kran och låt lösningen rinna genom kolonnen tills vätskenivån är cirka 1 cm ovanför kiselgelen.



▼ **M25**4.3.2 *Kolonnkromatografi*

Väg med en noggrannhet av 0,001 g upp  $2,5 \pm 0,1$  g filtrerad, homogeniserad och – om nödvändigt – avvattnad olja i en 50 ml mätkolv (4.1.7).

Lös oljan i ca 20 ml elueringslösning (4.2.3). Värm försiktigt vid behov för att underlätta upplösningen. Låt svalna till rumstemperatur och späd till märket med elueringslösningen.

Tillsätt med mätpipett 20 ml lösning i den enligt 4.3.1 iordningställda kolonnen. Öppna kranen och låt lösningen eluera tills den står i nivå med kiselgelen.

Eluera med 150 ml elueringslösning (4.2.3) i en takt av cirka 2 ml/minut (det tar då 60–70 min för 150 ml att passera genom kolonnen).

Samla upp eluatet i en 250 ml rundkolv (4.1.1) som i förväg kalibrerats i ugn och noggrant vägts. Avlägsna lösningsmedlet vid reducerat tryck i en rotationsindunstare (4.1.9) och väg den erhållna återstoden. Denna ska sedan användas vid beredning av lösningen för HPLC-analys och för beredningen av metylestrar.

Vad gäller kategorierna extra jungfruolja, jungfruolja, raffinerad olivolja och olivolja måste minst 90 % av provet passera genom kolonnen. För bomolja och olivolja av pressrester måste minst 80 % passera.

4.3.3 *Rening genom fastfasextraktion*

Fastfaskolonnen med kiseldioxid aktiveras genom att man låter 6 ml hexan (4.2.3) passera under vakuum, varvid kolonnen inte tillåts torka.

Väg med en noggrannhet av 0,001 g upp 0,12 g i en 2 ml provbehållare (4.1.15) och lös i 0,5 ml hexan (4.2.3).

Tillför lösningen till fastfaskolonnen och eluera med 10 ml hexandietylter (87:13 v/v) (4.2.3) under vakuum.

Låt den uppsamlade fraktionen indunsta till torrhet i en rotationsindunstare (4.1.9) under reducerat tryck vid rumstemperatur. Återstoden löses upp i 2 ml aceton (4.2.6) för bestämning av triglycerider.

4.4 **HPLC-analys**4.4.1 *Beredning av proverna för kromatografisk analys*

Bered en 5 % lösning av det prov som ska analyseras genom att väga upp  $0,5 \pm 0,001$  g av provet i en 10 ml mätkolv och späd med lösningsmedlet (4.2.9) till 10 ml.

4.4.2 *Förfarande*

Gör i ordning kromatografisystemet. Pumpa elueringslösningen (4.2.8) genom kolonnen med en hastighet av 1,5 ml/min för att rensa hela systemet. Vänta tills baslinjen stabiliserats.

Injicera 10 µl av det prov som beretts enligt punkt 4.3.

4.4.3 *Beräkning och redovisning av resultat*

Använd metoden med inre standard, dvs. antag att den sammanlagda arean av de toppar som motsvarar triglyceriderna från ECN 42 till ECN 52 är lika med 100 %.

Beräkna den relativa andelen för varje triglycerid med hjälp av formeln

$$\% \text{ triglycerid} = \text{topparea} \times 100 / \text{sammanlagd topparea.}$$

Resultaten ska anges med minst två decimaler.

Se noterna 1–4.

▼ **M25**4.5 **Beräkning av triglyceridsammansättning (molprocent) från data om fettsyrasammansättning (areaprocent)**4.5.1 *Bestämning av fettsyrasammansättning*

Fettsyrasammansättningen bestäms enligt ISO 5508 med hjälp av en kapillärkolonn. Metylestrarna bereds enligt COI/T.20/Doc. No 24.

4.5.2 *Fettsyror för beräkning*

Glycerider grupperas efter sina ekvivalenta koltal (ECN), varvid hänsyn tas till följande ekvivalensförhållanden mellan ECN och fettsyror. Enbart fettsyror med 16 och 18 kolatomer beaktas, eftersom endast dessa är av betydelse för olivolja. Fettsyror bör normaliseras till 100 %.

Fettsyra	Förkortning	Molekylvikt (MW)	ECN
Palmitinsyra	P	256,4	16
Palmitoleinsyra	Po	254,4	14
Stearinsyra	S	284,5	18
Oljesyra	O	282,5	16
Linolsyra	L	280,4	14
Linolensyra	Ln	278,4	12

4.5.3 *Omvandling av areaprocent till mol för alla fettsyror (1)*

$$\begin{aligned} \text{mol P} &= \frac{\text{area \% P}}{\text{MW P}} & \text{mol S} &= \frac{\text{area \% S}}{\text{MW S}} & \text{mol Po} &= \frac{\text{area \% Po}}{\text{MW Po}} \\ \text{mol O} &= \frac{\text{area \% O}}{\text{MW O}} & \text{mol L} &= \frac{\text{area \% L}}{\text{MW L}} & \text{mol Ln} &= \frac{\text{area \% Ln}}{\text{MW Ln}} \end{aligned}$$

4.5.4 *Normalisering av mol fettsyror till 100 % (2)*

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

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

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

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

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

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

Resultatet visar andelen av varje fettsyra i molprocent av triglyceridernas samtliga ställningar (1, 2, 3).

Sedan beräknas summan av de mättade fettsyror P och S (SFA) och de omättade fettsyror Po, O, L och Ln (UFA) (3)

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

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

▼ **M25**4.5.5 *Beräkning av fettsyrasammansättning i triglyceridernas 2- och 1,3-ställningar*

Fettsyrorna fördelas i tre grupper enligt följande: en för 2-ställning och två identiska för 1- och 3-ställning, med olika koefficienter för de mätade (P och S) och omättade fettsyror (Po, O, L och Ln).

## 4.5.5.1 Mättade fettsyror i 2-ställning [P(2) och S(2)] (4)

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

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

## 4.5.5.2 Omättade fettsyror i 2-ställning [Po(2), O(2), L(2) och Ln(2)] (5)

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

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

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

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

## 4.5.5.3 Fettsyror i 1,3-ställning [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) och Ln(1,3)] (6)

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

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

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

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

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

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

4.5.6 *Beräkning av triglycerider*

## 4.5.6.1 Triglycerider med en fettsyra (AAA, här LLL, PoPoPo) (7)

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

## 4.5.6.2 Triglycerider med två fettsyror (AAB, här PoPoL, PoLL) (8)

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

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

▼ **M25**

4.5.6.3 Triglycerider med tre olika fettsyror (ABC, här OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

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

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

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

4.5.6.4 Triglycerider med ECN 42

Triglycerider med ECN 42 beräknas i enlighet med formlerna 7, 8 och 9 och anges alltefter deras förväntade eluering i HPLC (vanligtvis endast tre toppar).

LLL

PoLL och ställningsisomeren LPoL

OLLn och ställningsisomererna OLnL och LnOL

PoPoL och ställningsisomeren PoLPo

PoOLn och ställningsisomererna OPoLn och OLnPo

PLLn och ställningsisomererna LLnP och LnPL

PoPoPo

SLnLn och ställningsisomeren LnSLn

PPoLn och ställningsisomererna PLnPo och PoPLn

Triglyceriderna med ECN 42 erhålls som summan av de nio triglyceriderna, inklusive deras ställningsisomerer. Resultaten ska anges med minst två decimaler.

## 5. UTVÄRDERING AV RESULTATEN

Det beräknade teoretiska innehållet jämförs med innehållet enligt HPLC-bestämningen. Om skillnaden i absolutvärde mellan HPLC-värdet och det teoretiska värdet är större än det värde som anges i standarden för motsvarande kategori olivolja, innehåller provet fröolja.

Resultaten ska anges med två decimaler.

## 6. EXEMPEL (SIFFRORNA AVSER PUNKTER I METODDELEN)

— 4.5.1 *Beräkning av molprocent fettsyror från gaskromatografiska data (areaprocent)*

Följande uppgifter erhålls för fettsyornas sammansättning genom gaskromatografi:

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

▼ **M25**

— 4.5.3 *Omvandling av areaprocent till mol för alla fettsyror (se formel [1])*

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

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

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

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

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

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

$$\text{Total} = 0,35821 \text{ mol TAGs}$$

— 4.5.4 *Normalisering av mol fettsyror till 100 % (se formel [2])*

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

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

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

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

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

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

$$\text{Summa molprocent} = 100 \%$$

Summa mättade och omättade fettsyror i 1, 2, 3-ställning hos triglyceriderna (se formel [3]):

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

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

— 4.5.5 *Beräkning av fettsyrasammansättning i 2- och 1,3-ställning i triglyceriderna*

— 4.5.5.1 *Mättade fettsyror i 2-ställning [P(2) och S(2)] (se formel [4])*

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

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

— 4.5.5.2 *Omättade fettsyror i 2-ställning [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) och Ln(1,3)] (se formel [5])*

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

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

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

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

▼ **M25**

- 4.5.5.3 Fettsyror i 1,3-ställning [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) och Ln(1,3)] (se formel [6])

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

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

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

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

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

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

- 4.5.6 *Beräkning av triglycerider*

Från den beräknade sammansättningen av fettsyror i sn-2- och sn-1,3-ställning

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

beräknas följande triglycerider:

LLL

PoPoPo

PoLL med 1 ställningsisomer

SLnLn med 1 ställningsisomer

PoPoL med 1 ställningsisomer

PPoLn med 2 ställningsisomerer

OLLn med 2 ställningsisomerer

PLLn med 2 ställningsisomerer

PoOLn med 2 ställningsisomerer

- 4.5.6.1 *Triglycerider med en fettsyra (LLL, PoPoPo) (se formel [7])*

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

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

▼ **M25**

— 4.5.6.2 Triglycerider med två fettsyror (PoLL, SLnLn, PoPoL) (Se formel [8])

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

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

**0,03210 mol PoLL**

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

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

**0,00094 mol SLnLn**

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

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

**0,00354 mol PoPoL**

— 4.5.6.3 Triglycerider med tre olika fettsyror (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) (se formel [9])

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

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

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

**0,00761 mol PPLn**

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

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

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

**0,43655 mol OLLn**

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

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

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

**0,06907 mol PLLn**

▼ **M25**

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

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

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

**0,04812 mol PoOLn**

**ECN42 = 0,69512 mol triglycerider**

*Anm.: 1:* Elueringsordningen kan bestämmas genom att man beräknar de ekvivalenta koltalen, som ofta definieras genom formeln  $ECN = CN - 2n$ , där CN är koltalet och n antalet dubbelbindningar. Koltalet kan beräknas mer exakt genom att hänsyn tas till dubbelbindningens ursprung. Om  $n_o$ ,  $n_l$  och  $n_{ln}$  är antalet dubbelbindningar i olje-, linol- respektive linolensyra kan det ekvivalenta koltalet beräknas med hjälp av formeln

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

där koefficienterna  $d_o$ ,  $d_l$  och  $d_{ln}$  kan beräknas med hjälp av referenstriglyceriderna. Under de förutsättningar som anges för denna metod kan det förhållande som erhålls approximeras av formeln

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

*Anm.: 2:* Om man använder sig av flera referenstriglycerider är det också möjligt att beräkna upplösningen med avseende på triolein

$$\alpha = RT^1 / RT \text{ triolein}$$

med hjälp av den reducerade retentionstiden  $RT^1 = RT - RT \text{ lösningsmedel}$

Grafen för  $\log \alpha$  som funktion av f (antalet dubbelbindningar) möjliggör bestämning av retentionsvärdena för alla triglycerider i referenstriglyceriderna – se figur 1.

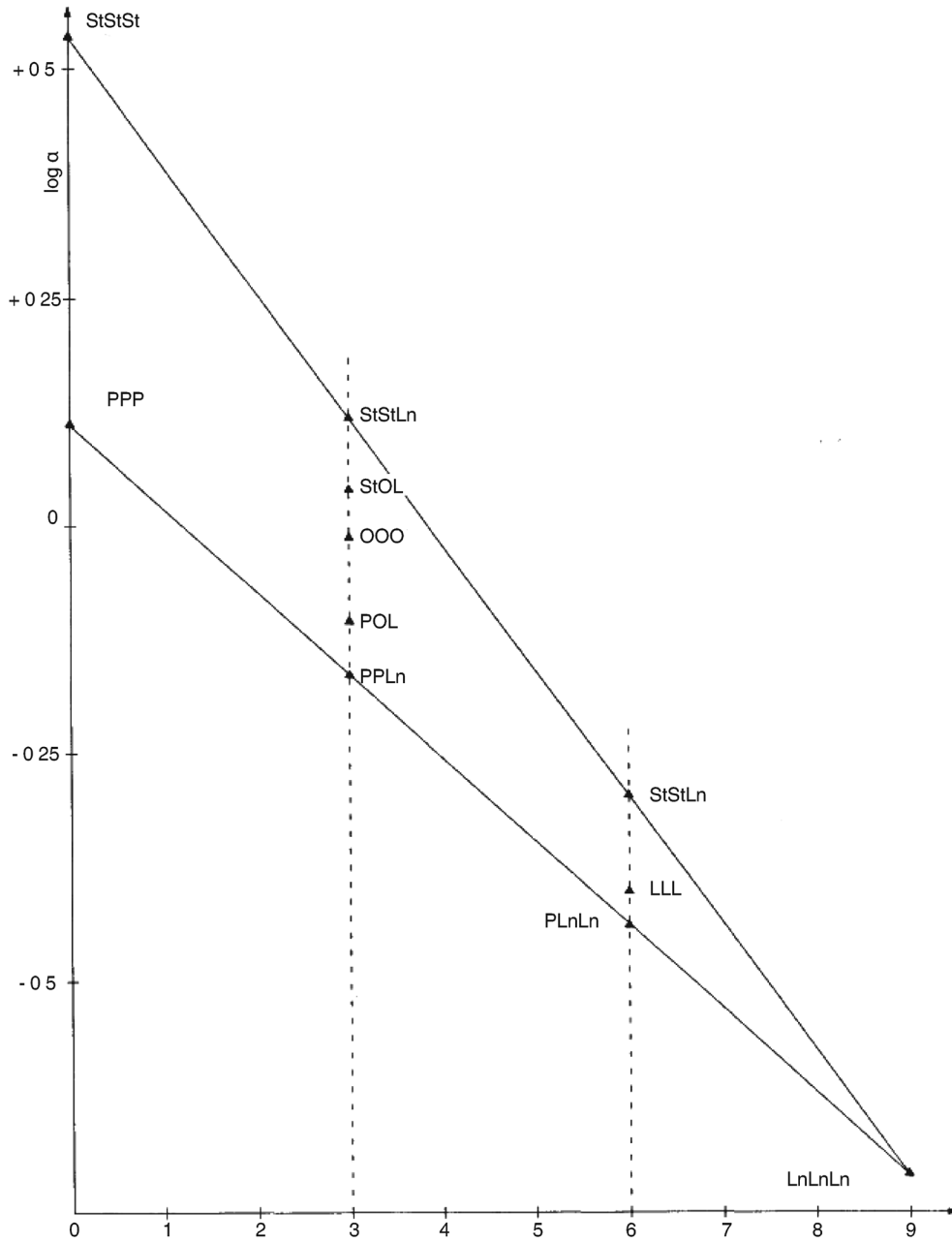
*Anm.: 3:* Kolonnen bör vara så beskaffad att den möjliggör en tydlig separering av toppen för trilinolein från topparna för de triglycerider som har närliggande retentionstider. Eluering görs fram till ECN 52-toppen.

*Anm.: 4:* För att få ett korrekt mått på arean av alla de toppar som är av intresse för denna undersökning måste den andra toppen, vilken motsvarar ECN 50, motsvara 50 % av skrivarens fulla skala.



## ▼ M25

Figur 1

log  $\alpha$  i förhållande till f (antal dubbelbindningar)

Antal dubbelbindningar

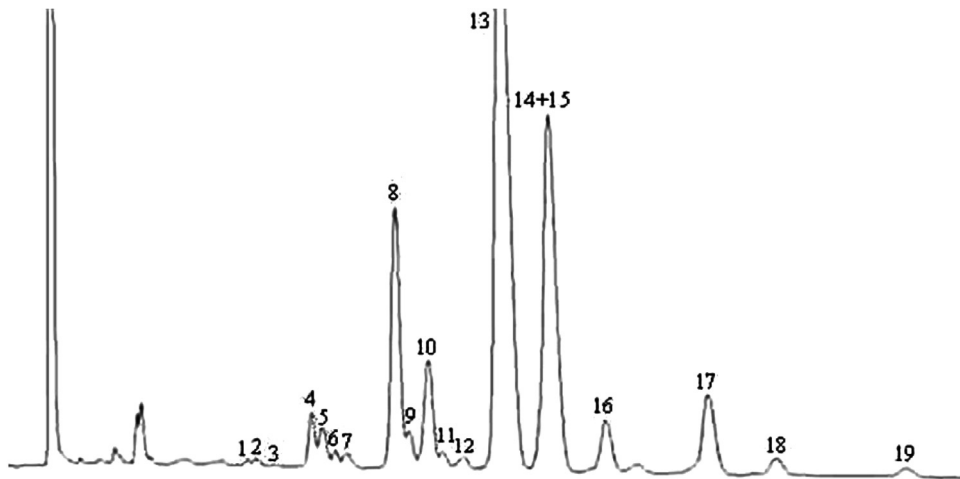
La: laurinsyra; My: myristinsyra; P: palmitinsyra; S: stearinsyra; O: oleinsyra; L: linolsyra; Ln: linolensyra.

## ▼ M25

Figur 2

## Olivolja med låg halt av linolsyra

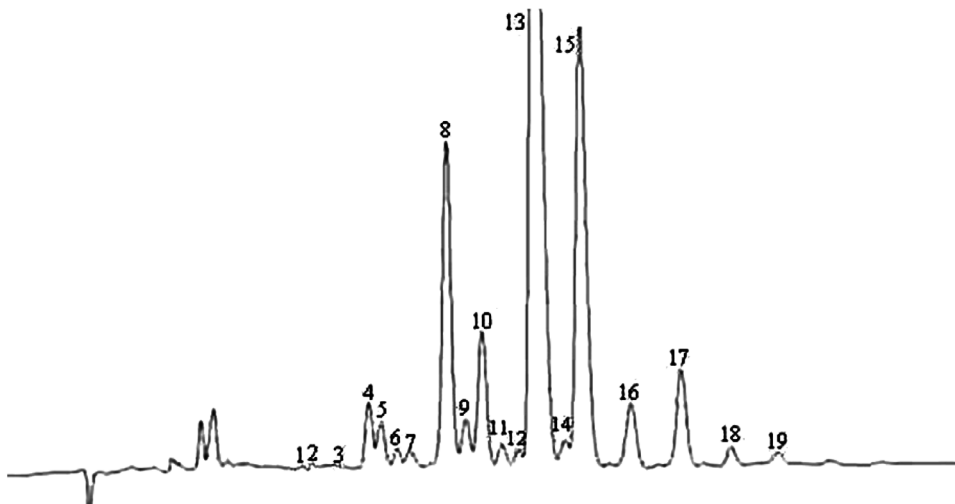
a



Med lösningsmedel: aceton/acetonitril.

Profil a: Viktigaste komponenter i de kromatografiska topparna: **ECN42:** (1) LLL + PoLL; (2) OLLn + PoOLn; (3) PLLn; **ECN44:** (4) OLL + PoOL; (5) OOLn + PLL; (6) POLn + PPOPo; (7) OOL + PoOO; **ECN46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48:** (13) OOO + PoPP; (14 + 15) SOL + POO; (16) POP; **ECN50:** (17) SOO; (18) POS + SLS.

b



Med lösningsmedel: propionitril.

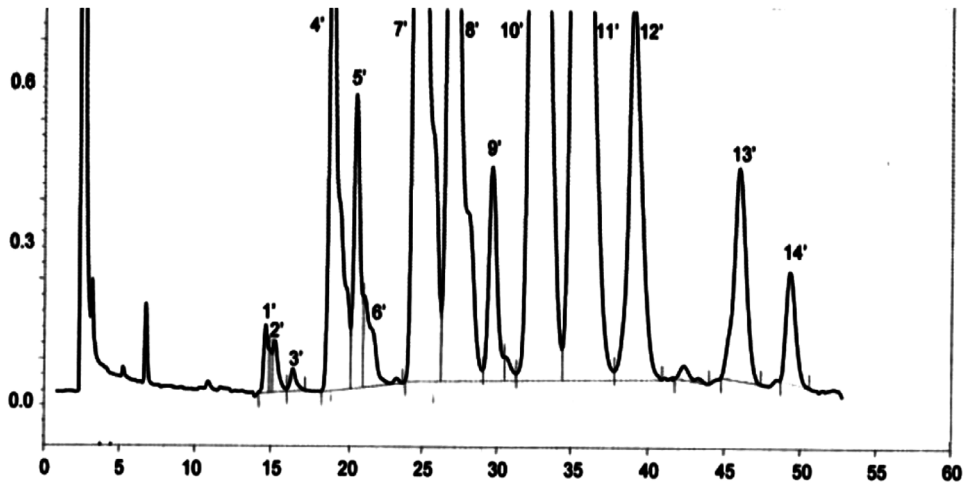
Profil b: Viktigaste komponenter i de kromatografiska topparna: **ECN42:** (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44:** (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48:** (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50:** (17) SOO; (18) POS + SLS

## ▼ M25

Figur 3

## Olivolja med hög halt av linolsyra

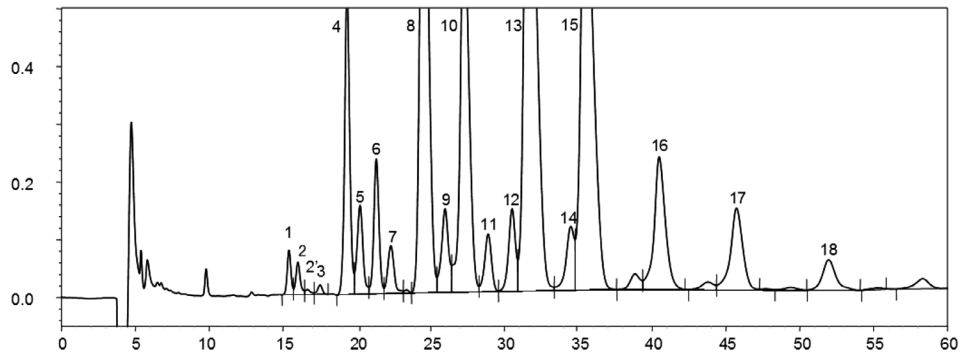
a



Med lösningsmedel: aceton/acetonitril (50:50).

Profil a: Viktigaste komponenter i de chromatografiska topparna: **ECN42**: (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; **ECN44**: (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPoPo; **ECN46**: (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; **ECN48**: (10') OOO; (11') POO + SLL + PPoO; (12') POP + PLS; **ECN50**: (13') SOO; (14') POS + SLS

b



Med lösningsmedel: Propionitril.

Profil b: Viktigaste komponenter i de chromatografiska topparna: **ECN42**: (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; **ECN48**: (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS; **ECN52**: (19) AOO.

**▼ M19***BILAGA XIX***▼ M28****BESTÄMNING AV HALTEN ALIFATISKA ALKOHOLER OCH TRITERPENALKOHOLER MED KAPILLÄRGASKROMATOGRAFI**

## 1. SYFTE

Denna bilaga beskriver en metod för bestämning av halten alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer, enskilt eller totalt, i oljor och fetter.

**▼ M19**

## 2. PRINCIP

Fettämnet med 1-eicosanol tillsatt som standard, förtvålbas med kaliumhydroxid i metanol varefter de oförtvålbara ämnena extraheras med etyleter. Alkoholfraktionen separeras från de oförtvålbara ämnena genom kromatografi på ett lager kiselgel impregnerat med kaliumhydroxid. Alkoholerna som återvunnits från kiselgelen överförs till trimetylsilyleterar och analyseras genom gaskromatografi med kapillärkolonn.

## 3. UTRUSTNING

3.1 250 ml kolv försedd med återflödeskylare med slipningar.

3.2 500 ml separertratt.

3.3 250 ml kolvar.

3.4 Komplet apparatur för analys med tunnskikt-kromatografi som använder glasplattor 20 × 20 cm.

3.5 Ultraviolet lamp med en våglängd av 366 eller 254 nm.

3.6 Mikrolitersprutor 100 µl och 500 µl.

3.7 En cylindrisk filtertratt med porositeten G3 (porositet 15 till 40 µm) och med en diameter på cirka 2 cm, ett djup på 5 cm och försedd med en hanslipning 12/21 som passar på en vakuumkolv.

3.8 50 ml vakuum-E-kolv med hanslipning 12/21 som kan användas för filtertratten (3.7).

3.9 10 ml provrör med konisk botten och propp.

3.10 Gaskromatograf för användning med kapillärkolonn och försedd med spaltningssystem som består av:

3.10.1 En termostatkammare för kolonner som kan bibehålla önskad temperatur med en noggrannhet av ± 1 °C.

3.10.2 En injektor med inställbar temperatur och försedd med ett förångnings-element av glas med silaniserad yta.

3.10.3 En flamjoniseringsdetektor och omformarförstärkare.

3.10.4 Integrerad registreringsenhet för användning med omformarförstärkaren med svarstider som inte överstiger 1 sekund och med variabel pappershastighet.

3.11 Kapillärkolonn av glas eller kvarts, längd 20 till 30 meter, innerdiameter 0,25 till 0,32 mm, med SE-52 eller SE-54 vätskefas eller motsvarande och med en filmtjocklek mellan 0,10 och 0,30 µm.

3.12 Mikrolitersprutor för gaskromatografi, 10 µl med härdad nål.

3.13 Precisionsvåg med en känslighet av 1 mg (med visning av 0,1 mg).

**▼ M19**

4. REAGENSER
- 4.1 Kaliumhydroxid, cirka 2 N etanollösning: 130 g kaliumhydroxid (med en lägsta koncentration av 85 %) löses under kylning i 200 ml destillerat vatten som sedan späds till en liter med etanol. Lösningen bör förvaras i en väl tillsluten mörk glasflaska.
- 4.2 Etyleter, P.A.
- 4.3 Vattenfritt natriumsulfat, P.A.
- 4.4 Glasplattor täckta med kiselgel utan fluorescensindikator, tjocklek 0,25 mm (finns i handeln färdiga för användning).
- 4.5 Kaliumhydroxid, cirka 0,2 N etanollösning. 13 g kaliumhydroxid löses i 20 ml destillerat vatten och spädes till en liter med etanol.
- 4.6 Bensen, för kromatografi (se 5.2.2).
- 4.7 Aceton, för kromatografi (se 5.2.2).
- 4.8 Hexan, för kromatografi (se 5.2.2).
- 4.9 Etyleter, för kromatografi (se 5.2.2).
- 4.10 Kloroform, P.A.

**▼ M28**

- 4.11 Referenslösning för tunnskikt-kromatografi: C<sub>20</sub>-C<sub>28</sub> alkoholer 0,5 % i kloroform, eller en fraktion av alkoholer som erhållits på det sätt som anges i punkt 5.2 från det oförtvåbara ämnet av en olivolja av pressrester.

**▼ M19**

- 4.12 2,7-diklorfluorecein, 0,2 % etanollösning. Denna görs lätt alkalisk genom tillsats av ett par droppar 2 N etanollösning av kaliumhydroxid.
- 4.13 Vattenfri pyridin, för kromatografi.
- 4.14 Hexametyldisilasan.
- 4.15 Trimetylklorosilan.
- 4.16 Standardlösningar av trimetylsilyleter av alifatiska alkoholer från C<sub>20</sub> till C<sub>28</sub>. Framställs av blandningar av rena alkoholer omedelbart innan de skall användas.
- 4.17 En 0,1 % (m/v) lösning av 1-eicosanol i CHCl<sub>3</sub> (inre standard).
- 4.18 Bärgas: väte eller helium, ren för gaskromatografi.
- 4.19 Supplemerande gaser: kväve, ren för gaskromatografi.
5. UTFÖRANDE
- 5.1 **Preparering av oförtvåbara ämnen**
- 5.1.1 Inför med hjälp av en 500 µl spruta i en 250 ml rundkolv en volym av 0,1 % 1-eicosanol-lösning (4.17) som innehåller en kvantitet av 1-eicosanol som ungefärligen motsvarar 10 % av halten alifatiska alkoholer i den del av provet som tagits ut för analys. Tillsätt t.ex. 5 gram av provet 250 µl av den 0,1 % 1-eicosanol-lösningen om det gäller olivolja och 1 500 µl om det gäller olivolja av pressrester.

Indunsta till torrhet under en ström av kväve och väg upp exakt 5 g torrt filtrerat prov i kolven.

▼ **M19**

5.1.2 50 ml 2 N etanollösning av kaliumhydroxid i etanol tillsätts, sätt på återflödeskylare och värm upp apparaten till sakta kokning på ångbad under kontinuerlig omrörning under hela uppvärmningsprocessen tills förtvålning har inträtt (lösningen blir klar). Fortsätt upphettningen under ytterligare 20 minuter, och tillsätt sedan 50 ml destillerat vatten genom återflödeskylaren, ta bort kylaren och kyl kolven till cirka 30 °C.

5.1.3 Innehållet i kolven överförs kvantitativt till en separertratt på 500 ml och sköljs upprepade gånger med destillerat vatten av en mängd som totalt får uppgå till 50 ml. Tillsätt cirka 80 ml etyleter, skaka omsorgsfullt i ungefär 30 sekunder och låt sedan innehållet separera (*anm* 1).

Separera av den lägre vattenfasen i en ny separertratt. Ytterligare två extraktioner görs på vattenfasen på samma sätt, varje gång med användning av 60 till 70 ml etyleter.

*Anm. 1:* Eventuell emulsion kan tas bort genom tillsats av små kvantiteter etanol eller metanol i sprayform.

5.1.4 Etyleterextrakten samlas i en separertratt och tvättas med destillerat vatten (50 ml åt gången) tills tvättvattnet ger neutral reaktion.

Kasta bort vattenfasen, torka med vattenfritt natriumsulfat och filtrera i en kolv på 250 ml som har vägts innan. Tratten och filtret tvättas med små kvantiteter etyleter som läggs till etyleterfasen.

5.1.5 Etern indunstas under försiktig uppvärmning till några ml och torkas under lätt undertryck eller under ström av kväve. Torkningen avslutas i torkskåp vid 100 °C i ca 15 minuter och återstoden vägs sedan den svalnat i exsickator.

## 5.2 Separering av alkoholfraktionerna

5.2.1 Förberedning av alkaliska plattor: sänk ner silicagelplattorna (4.4) helt i 0,2 N kaliumhydroxidlösning i etanol (4.5) i tio sekunder och låt sedan verka; torka väl i dragskåp i två timmar och placera slutligen i ett värmeskåp vid 100 °C i en timme.

Ta ut plattorna från torkskåpet och förvara dem i en exsickator med kalciumklorid tills de skall användas (plattor som behandlas på detta sätt måste användas inom 15 dagar).

*Anm. 2:* När kiselgelplattor används för separation av alkoholfraktionen behöver inte oförtvålbara ämnen behandlas med aluminium. På detta sätt återfås alla sura komponenter (feta syror och övriga) på ursprungsprovets linje. Man får också banden för de alifatiska alkoholerna och terpenalkoholerna separerade av sterolbandet.

5.2.2 Fyll på en blandning av 65:35 räknat per volym av hexan och etyleter i framkallningskammaren till ett djup av cirka 1 cm <sup>(1)</sup>.

Kammaren försluts med ett passande lock och får stå minst en halvtimme för att tillåta att jämvikt inträder mellan gas och vätska. Remsor av filterpapper som doppas ner i eluenten kan placeras på insidan av tankens ytor för att minska framkallningstiden med ungefär en tredjedel och få en jämnare eluering av komponenterna.

<sup>(1)</sup> I särskilda fall måste 95:5 (v/v) bensen/acetoblandning användas för att få en god separation av banden.

**▼ M19**

*Anm. 3:* Framkallningslösningen måste ersättas för varje analys för att få reproducerbara framkallningsförhållanden.

- 5.2.3 En cirka 5 % lösning av oförtvåbara ämnen (5.1.5) i kloroform iordningsställs och 0,3 ml av lösningen stryks ut jämnt till minsta möjliga tjocklek med hjälp av en mikrospruta på 100 µl på en TLC-platta cirka 2 cm från dess nederkant. I jämnhöjd med ursprungsprovet placeras 2–3 µl av referenslösningen med alifatiska alkoholer (4.11) för att man skall kunna känna igen de alifatiska alkoholernas band efter det att framkallningen har genomförts.
- 5.2.4 Plattan placeras i framkallningskammaren som anges i 5.2.2. Omgivningstemperaturen skall hållas mellan 15 och 20 °C. Stäng kammaren omedelbart med locket och påbörja elueringen tills lösningsmedlets främre kant når till cirka 1 cm från övre änden av plattan.

Plattan tas sedan bort från framkallningskammaren och lösningsmedlet får avdunsta i varmluftström eller också får plattan torka en stund i dragskåp.

**▼ M28**

- 5.2.5 Plattan sprayas lätt och jämnt med en lösning av 2,7-diklorfluorescein. Bandet för alifatiska alkoholer kan identifieras som det som ligger i höjd med den fläck som erhållits från referenslösningen. Markera bandets gränser med svart blyerts; bandet för alifatiska alkoholer och det band som är omedelbart ovanför detta, dvs. terpenalkoholbandet markeras tillsammans (anm. 4).

*Anm. 4:* Bandet för alifatiska alkoholer och terpenalkoholbandet förs samman eftersom en del alifatiska alkoholer kan gå över till triterpenalkoholbandet. Ett exempel på TLC-separation i anges i figur 1 i tillägget.

- 5.2.6 Skrapa med hjälp av en metallspatel bort kiselgelen i den markerade arean. Placera det finfördelade materialet som tagits bort i filtrertratten (3.7). Tillsätt 10 ml het kloroform, rör försiktigt med metallspateln och filtrera i vakuum-E-kolven (3.8) som är ansluten till filtrertratten.

Tvätta kiselgelen i kolven tre gånger med etyleter (ca 10 ml varje gång) och samla filtratet i samma kolv som är ansluten till filtrertratten. Indunsta filtratet till en volym på 4–5 ml, överför lösningen till ett vägt 10 ml provrör (3.9), indunsta till torrhet genom lätt uppvärmning i ett svagt kvävgasflöde, lös igen med hjälp av ett par droppar aceton, indunsta igen till torrhet, placera i ett värmeskåp vid 105 °C i cirka 10 minuter och låt sedan provet svalna i exsickator och väg det.

Återstoden i provröret består av alkoholfraktionen.

**▼ M19****5.3 Beredning av trimetylsilyleter**

- 5.3.1 Reagensen för silyleringen, som består av en blandning av 9:3:1 räknat per volym (*anm. 5*) av pyridinhexametyldisilazeten-trimetylklorosilan i förhållandet 50 µl för varje mg alkoholer tillsätts till provröret som innehåller alkoholfraktionen, varvid ingen fukt får absorberas (*anm. 6*).

▼ **M19**

*Anm. 5:* Lösningar som är klara för användning kan köpas färdiga. Dessutom finns också andra silaniseringsreagenser som t.ex. bis-trimetylsilyl, trifluoracetamid + 1 % trimetylklorosilan, som måste spädas med lika stor mängd vattenfri pyridin tillgängliga.

*Anm. 6:* Eventuell bildning av en svag opalescens är normalt och inverkar inte. Bildandet av en vit flockig fyllning eller rosafärgning är tecken på närvaro av fukt och sönderfall hos reagensen. Om detta inträffar skall provet upprepas.

- 5.3.2 Provröret förses med propp och skakas om försiktigt utan att det vänds, tills alkoholerna har blivit lösliga. Låt stå i minst 15 minuter i rumstemperatur och centrifugera sedan i ett par minuter. Den klara lösningen är nu färdig för analys med gaskromatografi.

#### 5.4 **Analys med gaskromatografi**

##### 5.4.1 Förberedelser och iordningsställande av kapillärkolonnen

- 5.4.1.1 Kapillärkolonnen placeras inuti gaskromatografen genom att kolonnens inlopp ansluts till injektorblocket som är ansluten till spaltningssystemet och andra änden av kolonnen till detektorn. En allmän kontroll av gaskromatografen genomförs (gasanslutningarna skall vara täta, detektorn i fullgott skick, fungerande spaltningssystem och registreringsystem etc).

- 5.4.1.2 Kapillärkolonner som används för första gången skall prepareras. En liten mängd bärgas får flyta igenom kapillärkolonnen och sedan kopplas gaskromatografen på och en gradvis upphettning genomförs tills temperaturen är minst 20 °C över drifttemperaturen (se *anm. 7*). Temperaturen bibehålls i minst två timmar och sedan ställs kromatografen i ordning för driftförhållanden (inställning av gasflöde, tändning av delningsflamma, anslutning till den elektroniska registreringen, inställning av temperaturen i kapillärkolonnens ugn, detektorn och injektorn) signalen ställs in på en känslighet som är minst två gånger den högsta nivån som beräknas för genomförande av analysen. Baslinjens streck skall vara linjärt, inte ha några spikar oavsett ursprung och inte visa tecken på att driva. Negativ drift av linjen är tecken på otäta kolonnanslutningar medan en positiv drift tyder på otillräcklig preparering av kolonnen.

*Anm. 7:* Temperaturen vid prepareringen skall vara minst 20 °C lägre än maximitemperaturen som beräknas för den vätskefas som används.

##### 5.4.2 Val av driftförhållanden

###### 5.4.2.1 Följande riktlinjer gäller för kromatografins utförande:

— kolonntemperaturen: startisotermen ställs in vid 180 °C i åtta minuter och programmeras sedan med 5 °C per minut till 260 °C och ytterligare 15 minuter vid 260 °C,

— injektorblockets temperatur: 280 °C,

— detektorns temperatur: 290 °C,

— linjär hastighet för bärgasen: helium 20 till 35 cm/s, väte 30 till 50 cm/s,

— delningsförhållande: 1:50 till 1:100,

— instrumentets känslighet: 4 till 16 gånger högre än minimikänsligheten,



**▼ M19**

- registreringskänslighet: 1 till 2 mV,
- pappershastighet: 30 till 60 cm/tim,
- kvantitet av det injicerade ämnet: 0,5 till 1 µl av TMSE-lösning.

Dessa förhållanden kan varieras beroende på egenskaper hos kolonn och gaskromatograf för att få kromatogram som uppfyller följande krav:

- alkoholretentionstiden  $C_{26}$  skall vara  $18 \pm 5$  minuter,
- toppen för alkoholen  $C_{22}$  skall vara  $80 \pm 20$  % av hela skalvärdet för olivolja och  $40 \pm 20$  % av hela skalvärdet för fröolja.

5.4.2.2 Att de tidigare nämnda kraven är uppfyllda kontrolleras genom en upprepade injicering av den ställda TMSE-blandningen av alkoholer, och driftförhållandena justeras för att ge bästa resultat.

5.4.2.3 Parametrarna för integrering av topparna skall ställas in så att en korrekt uppskattning av topparnas ytor erhålls.

#### 5.4.3 Analysförfarande

5.4.3.1 Sug med hjälp av en 10 µl spruta upp 1 µl hexan, sug in 0,5 µl luft och sedan 0,5 till 1 µl av provlösningen. Drag ut kolven ur sprutan ytterligare så att kanylen töms. Kör in kanylen genom membranet i injektionsenheten och spruta snabbt efter en till två sekunder in innehållet och drag sedan sakta ut kanylen efter cirka fem sekunder.

5.4.3.2 Registreringen genomförs tills de närvarande alkoholernas TMSE har eluerats totalt. Baslinjen skall alltid motsvara kraven i 5.4.1.2.

**▼ M28**

#### 5.4.4 Identifiering av toppar

Identifieringen av enskilda toppar genomförs med ledning av retentionstiderna och genom jämförelse med den ställda TMSE-lösningen som analyseras under samma förhållanden.

Exempel på kromatogram av alkoholfraktionen av en jungfruolja visas i figurerna 2 och 3 i tillägget.

**▼ M19**

#### 5.4.5 Kvantitativ utvärdering

5.4.5.1 Toppområdena för 1-eicosanol och de alifatiska alkoholerna  $C_{22}$ ,  $C_{24}$ ,  $C_{26}$  och  $C_{28}$  beräknas genom elektronisk integrering.

5.4.5.2 Halten av varje enskild alifatisk alkohol uttryckt i mg/ 1 000 g fettämne beräknas på följande sätt:

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

där:

$A_x$  = toppområde för alkohol x

$A_s$  = toppområde för 1-eicosanol

$m_s$  = vikt för 1-eicosanol, i mg

$m$  = vikt för provet som tagits ut för analys, i gram

## 6. RESULTATANGIVELSE

Innehållet av de enskilda alifatiska alkoholerna i mg/1 000 g fettämne och summan av de totala alifatiska alkoholerna antecknas.

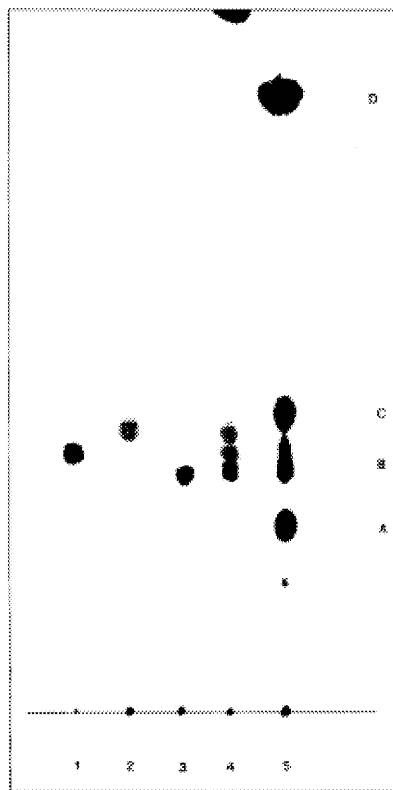
▼ M28

Tillägg

Exempel på TLC-separation och exempel på kromatogram

Figur 1

Tunnskiktskromatografiplatta av de oförtvåbara fraktionerna från olivolja  
eluerad med hexan/dietyleter (65/35)

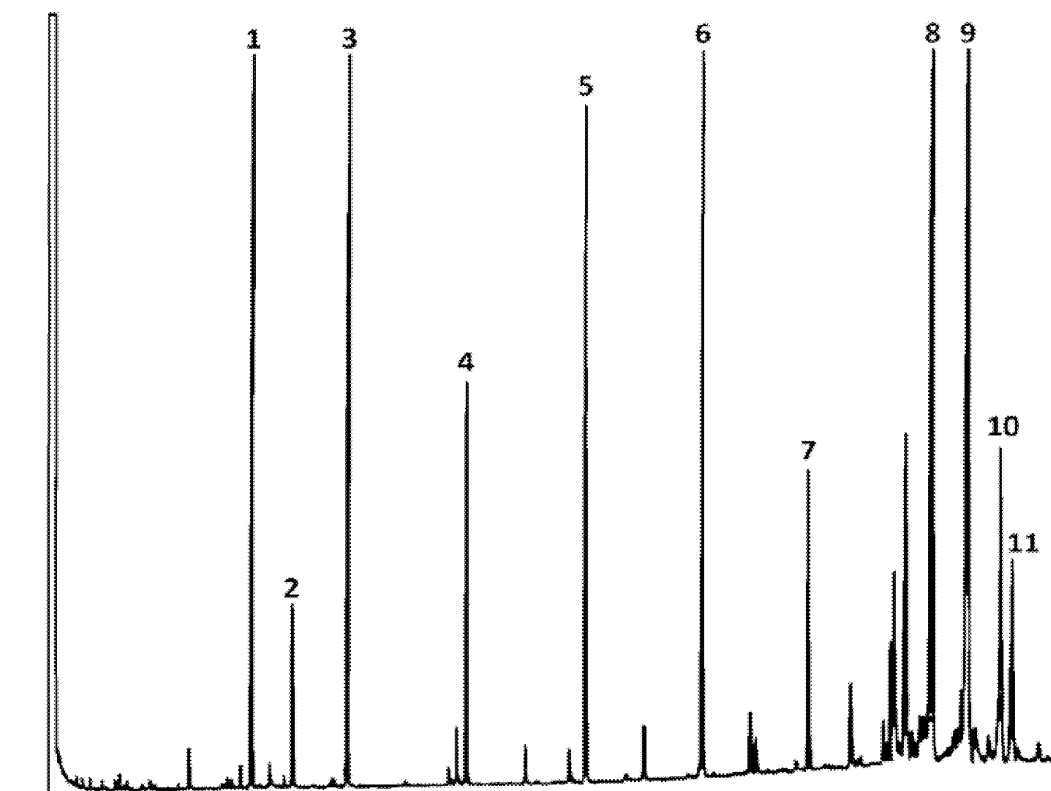


- |   |   |   |                      |
|---|---|---|----------------------|
| 1 | Alkohol C <sub>26</sub>                         | A | Steroler             |
| 2 | Alkohol C <sub>30</sub>                         | B | Alifatiska alkoholer |
| 3 | Alkohol C <sub>20</sub>                         | C | Triterpenalkoholer   |
| 4 | Blandning av alkoholer C <sub>20-22-26-30</sub> | D | Skvalen              |
| 5 | Extra jungfruolja oförtvåbar                    |   |                      |

▼ M28

Figur 2

Kromatogram för alkoholfraktionen av en raffinerad olivolja



1 = Fytol

2 = Geranylgeraniol

3 = Alkohol C<sub>20</sub> (IS)4 = Alkohol C<sub>22</sub>5 = Alkohol C<sub>24</sub>6 = Alkohol C<sub>26</sub>7 = Alkohol C<sub>28</sub>

8 = Cykloartenol

9 = 24-Metylen-cykloartenol

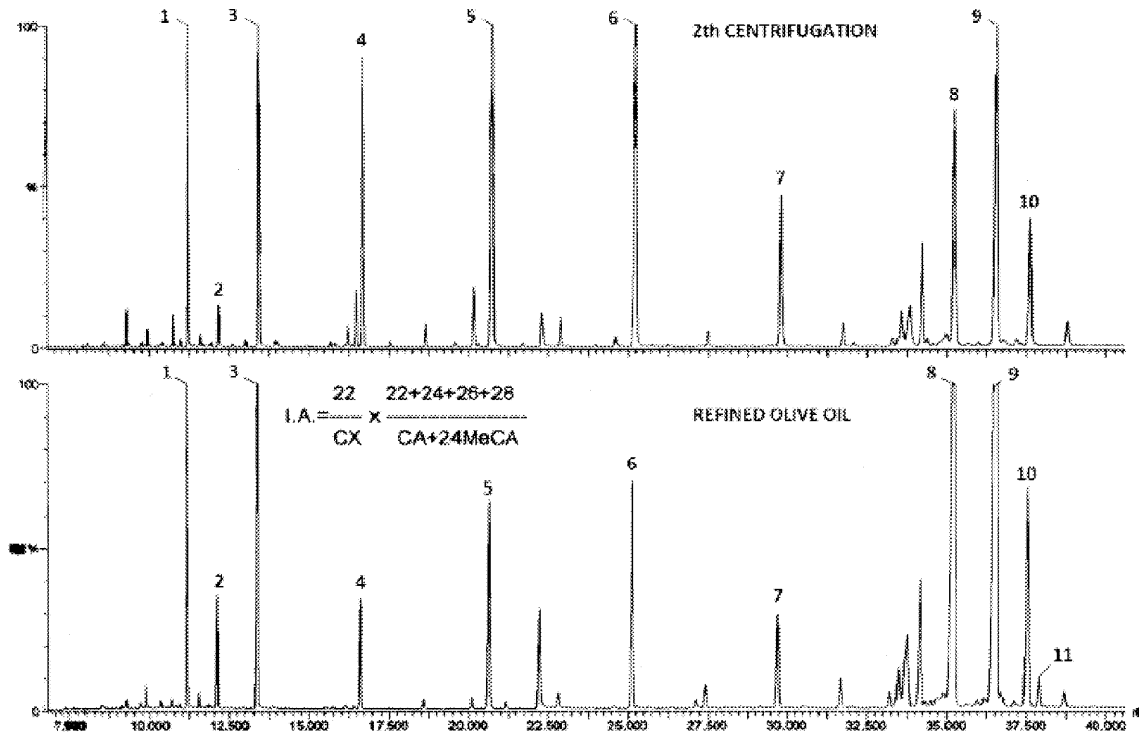
10 = Citrostadienol

11 = Cyklobranol

## ▼ M28

Figur 3

Alifatiska alkoholer och triterpenalkoholer hos en raffinerad olivolja och en olivolja efter andra centrifugeringen



1 = Fytol

2 = Geranylgeraniol

3 = Alkohol C<sub>20</sub> (IS)4 = Alkohol C<sub>22</sub>5 = Alkohol C<sub>24</sub>6 = Alkohol C<sub>26</sub>7 = Alkohol C<sub>28</sub>

8 = Cykloartenol

9 = 24-Metylen-cykloartenol  
(24MeCA)

10 = Citrostadienol

11 = Cyklobranol

▼ **M23***BILAGA XX***Metod för bestämning av halter av vaxer, fettsyreetylstrar och fettsyremetylstrar med kapillärgaskromatografi**

## 1. SYFTE

Denna metod är avsedd för bestämning av halterna av vaxer, fettsyreetylstrar och fettsyremetylstrar i olivolja. De enskilda vaxerna och alkylstrarna separeras efter antalet kolatomer. Metoden rekommenderas som ett redskap för att skilja olivolja från olivolja av olivrestprodukter (pressrester) och som en kvalitetsparameter för extrajungfruolivolja då metoden gör det möjligt att spåra otillåtna tillsatser av olja av lägre kvalitet (oavsett om det rör sig om tillsatser av jungfruolja, bomolja eller vissa doftfria oljor).

## 2. PRINCIP

En lämplig intern standard tillsätts oljan som därefter fraktioneras genom kromatografi på kiselgelkolonn. Den fraktion som först elueras under testförhållandena (och som har lägre polaritet än triglyceriderna) samlas upp och analyseras därefter direkt med hjälp av kapillärgaskromatografi.

## 3. UTRUSTNING

3.1. **E-kolv, 25 ml**3.2. **Vätskekromatografikolonn av glas**, innerdiameter 15 mm, längd 30–40 cm, med kran.3.3. **Gaskromatograf** som är anpassad till kapillärkolonn, utrustad med ett system för direktinjektion i kolonnen och bestående av följande:3.3.1. **Termostatstyrd ugn med möjlighet att programmera temperaturen.**3.3.2. **Kallinjektor** för direktinjektion av provet i kolonnen3.3.3. **En flamjonisationsdetektor och förstärkare.**3.3.4. **Skrivare/integrator** (se not 1) som är anpassad till förstärkaren (punkt 3.3.3), med responstid på högst en sekund och med variabel pappershastighet.

*Not 1:* Datoriserade system får också användas om gaskromatografiuppgifterna läggs in på dator.

3.3.5. **Kapillärkolonn av kvarts (för analys av vaxer och metyl- och etylstrar)**, längd 8–12 m, innerdiameter 0,25–0,32 mm, vars vätskefas (se not 2) har en enhetlig filmtjocklek på 0,10–0,30 µm.

*Not 2:* Lämpliga kommersiella vätskefaser finns tillgängliga för detta syfte, t.ex. SE52, SE54 etc.

3.4. **Mikrospruta**, 10 µl, med härdad nål för direkt insprutning i kolonnen3.5. **Elektrisk skakanordning.**3.6. **Rotationsindunstare.**3.7. **Muffelugn.**3.8. **Analysvåg** för vägning med en noggrannhet på ± 0,1 mg.

▼ **M23**

3.9. Laboratorieglass av standardtyp.

4. REAGENSER

4.1. **Kiselgel**, 60-200 µm mesh. Placera kiselgelen i muffelugnen vid 500 °C under minst fyra timmar. Efter kylning tillsätt 2 % vatten till kiselgelen. Skaka ordentligt för att homogenisera uppslamning och låt ligga i exsikator under minst tolv timmar före användning.

4.2. **n-hexan**, för kromatografi eller bedömning av återstoder (renheten måste kontrolleras).

WARNING – Ångorna kan fatta eld. Förvaras avskilt från värmekällor, gnistor och öppna lågor. Se till att flaskorna alltid är ordentligt förslutna. Sörj för ordentlig ventilation under användningen. Se till att det inte bildas ångor och undanröj alla eventuella brandrisker, som uppvärmningsapparater och elektriska apparater som inte är tillverkade av brandsäkra material. Ämnet är farligt vid inandning och kan orsaka skador på nervceller. Ångorna får inte inhaleras. Använd lämplig andningsutrustning vid behov. Undvik kontakt med huden och ögonen.

4.3. **Etyleter för kromatografi.**

WARNING – Mycket lättantändligt och måttligt giftigt. Irriterande för huden. Farligt vid inandning. Kan skada organen. Effekten kan vara fördröjd. Kan bilda explosiva peroxider. Ångorna kan fatta eld. Förvaras avskilt från värmekällor, gnistor och öppna lågor. Se till att flaskorna alltid är ordentligt förslutna. Sörj för ordentlig ventilation under användningen. Se till att det inte bildas ångor och undanröj alla eventuella brandrisker, som uppvärmningsapparater och elektriska apparater som inte är tillverkade av brandsäkra material. Låt inte etyletrarna avdunsta så mycket att de torkar eller nästan torkar. Tillsätt vatten eller en lämplig reduktionsagent för att motverka peroxidbildning. Får ej förtäras. Ångorna får inte inhaleras. Undvik längre eller upprepad hudkontakt.

4.4. **n-heptan**, för kromatografi, eller **iso-oktan**.

WARNING – Lättantändligt. Farligt vid inandning. Förvaras avskilt från värmekällor, gnistor och öppna lågor. Se till att flaskorna alltid är ordentligt förslutna. Sörj för ordentlig ventilation under användningen. Ångorna får inte inhaleras. Undvik längre eller upprepad hudkontakt.

4.5. **Standardlösning av 0,05 % (m/v) laurylarakidat** (se not 3) i heptan (intern standard för vaxer).

Not 3: Även palmitylpalmitat, myristylstearat eller arakidlaureat kan användas.

4.6. **Standardlösning av 0,02 % (m/V) metylheptadekanoat i heptan** (intern standard metylestrar och etylestrar).

4.7. **Sudan-1-(1-fenylazo-2-naftol)**

**▼ M23****4.8. Bärgas: vätgas eller helium, ren, för gaskromatografi.****VARNING**

*Väte.* Under tryck är väte mycket lättantändligt. Förvaras avskilt från värmekällor, gnistor och öppna lågor och elektriska apparater som inte är tillverkade av brandsäkra material. Se till att ventilen är stängd när flaskan inte används. Använd alltid en reduceringsventil. Fjädern ska vara helt lös innan flaskventilen öppnas. Stå inte framför flasköppningen när ventilen öppnas. Sörj för ordentlig ventilation under användningen. För inte över väte från en flaska till en annan. Blanda inte gaser i flaskan. Se till att flaskorna inte kan slås omkull. Håll dem avskärmade från solljus och värmekällor. Förvara dem i korrosionsskyddad miljö. Använd inte skadade eller omärkta flaskor.

*Helium.* Komprimerad gas under högt tryck, som minskar andelen syre i luften. Se till att flaskan är försluten. Sörj för ordentlig ventilation under användningen. Gå inte in i lagringsutrymmet om det inte är ordentligt ventilerat. Använd alltid en tryckreduceringsventil. Fjädern ska vara helt lös innan flaskventilen öppnas. För inte över gas från en flaska till en annan. Se till att flaskorna inte kan slås omkull. Stå inte över flasköppningen när ventilen öppnas. Håll dem avskärmade från solljus och värmekällor. Förvara dem i korrosionsskyddad miljö. Använd inte skadade eller omärkta flaskor. Inandas inte gasen. Använd endast gasen för tekniska ändamål.

**4.9. Hjälpgas:**

— Väte, rent, till gaskromatografi.

— Luft, ren, till gaskromatografi.

**VARNING**

*Luft.* Komprimerad gas vid högt tryck. Använd med försiktighet i närheten av brännbara ämnen eftersom flampunkten för de flesta organiska föreningar i luften är betydligt lägre vid högt tryck. Se till att ventilen är stängd när flaskan inte används. Använd alltid en reduceringsventil. Fjädern ska vara helt lös innan flaskventilen öppnas. Stå inte framför flasköppningen när ventilen öppnas. För inte över gas från en flaska till en annan. Blanda inte gaser i flaskan. Se till att flaskorna inte kan slås omkull. Håll dem avskärmade från solljus och värmekällor. Förvara dem i korrosionsskyddande miljö. Använd inte skadade eller omärkta flaskor. Luft avsedd för teknisk användning får inte användas i inhalations- eller andningsutrustning.

**5. METOD****5.1. Preparering av kromatografikolonnen**

Slamma upp 15 g kiselgel (4.1.) i n-hexan (4.2.) och håll det i kolonnen (3.2.). Låt kiselgelen sedimentera. Slutför sedimenteringen med hjälp av en elektrisk vibrator för att göra det kromatografiska stationära fasen mer homogent packad. Skölj med 30 ml n-hexan för att avlägsna eventuella orenheter. Använd analysvåg (3.8) för att med exakthet väga upp 500 mg av provet i en 25 ml kolv (3.1) och tillsätt en passande mängd intern standard (4.5), beroende på det uppskattade växinnehållet, t.ex. tillsätt 0,1 mg laurylarakidat till pressad olivolja, och 0,25-0,5 mg till olivolja av pressrester samt 0,05 mg metylheptadekanoat för olivoljor (4.6).

▼ **M23**

Det preparerade provet överförs sedan till kromatografikolonnen tillsammans med två portioner n-hexan (4.2) på 2 ml vardera.

Låt lösningsmedlet stå 1 mm över kolonnmaterialiet. Tillsätt ytterligare n-hexan/etyleterblandningen (99:1) och samla upp 220 ml med en hastighet på cirka 15 droppar/10 s. **(Denna fraktion innehåller metyl- och etylestrarna och vaxer).** (Not 4) (Not 5).

*Not 4:* n-hexan/etyleterblandningen (99:1) ska beredas varje dag.

*Not 5:* För en visuell kontroll av att elueringen av vaxerna sker korrekt kan 100 µl 1-(fenyloazo)-2-naftalenol (färgämnet Sudan 1) tillsättas elueringsblandningen.

*Färgämnets retentionstid ligger mellan vaxernas och triglyceridernas respektive retentionstid. När färgämnet når botten av kromatografikolonnen måste elueringen avslutas eftersom alla vaxer då har eluerats.*

Förånga den framtagna fraktionen i en rotationsindunstare tills nästan allt lösningsmedel försvunnit. Avlägsna de sista 2 ml av lösningsmedlet med hjälp av en svag kväveström. Späd den uppsamlade fraktionen innehållande metyl- och etylestrarna med 2-4 ml n-heptan eller iso-oktan.

## 5.2. Analys med gaskromatografi

### 5.2.1. Inledande metod

Montera kolonnen i gaskromatografen (3.3) genom att ansluta inloppet till injektionssystemet och utloppet till detektorn. Kontrollera gaskromatografen (att gasanslutningarna är täta, detektorns och skrivarens effektivitet, etc.).

Om kolonnen används för första gången bör den först konditioneras. Låt en liten mängd bärargas flyta genom kolonnen och sätt sedan på gaskromatografen. Upphetta gradvis under ca. 450 °C till en temperatur på 350 °C.

Behåll denna temperatur i minst två timmar och ställ därefter in apparaturen enligt analysparametrarna (inställning av gasflöde, tändning av delningsflamma, anslutning till den elektroniska registreringen (3.3.4), inställning av temperaturen i kolonnens ugn, detektorn etc.). Ställ in signalen på en känslighet som är minst två gånger högre än den nivå som krävs för analysen. Baslinjen ska vara linjär, inte ha några toppar och får inte driva.

Om baslinjen driver nedåt tyder det på att kolonnen inte är korrekt ansluten medan en positiv drift tyder på att kolonnen inte har blivit ordentligt konditionerad.

### 5.2.2. Val av analysparametrar för vaxer och metyl- och etylestrar (Not 6).

Analysparametrarna väljs normalt enligt följande:

— Kolonntemperatur:

20 °C/min 5 °C/min

Från 80 °C (1') ————— 140 °C ————— 335 °C (20)

— Detektortemperatur: 350 °C.

— Insprutad mängd: 1 µl lösning (2–4 ml) n-heptan.



**▼ M23**

— Bärigas: helium eller vätgas med en linjär hastighet som är optimal för den gas som valts (se tillägg A).

— Instrumentets känslighet: Lämplig för att uppfylla ovanstående krav.

*Not 6:* På grund av den höga sluttemperaturen tillåts en positiv drift på upp till 10 % av fullt skalutslag.

Beroende på kolonnens och gaskromatografens egenskaper kan betingelserna behöva ändras för att man ska få en separation av samtliga vaxer, en tillfredsställande upplösning av toppar (se figurerna 2, 3 och 4) och en retentionstid för den interna standarden laurylarkinat på  $18 \pm 3$  minuter. Vaxernas mest representativa topp ska motsvara minst 60 % av fullt skalutslag, medan den interna standarden för metyl- och etylestrar, metylheptadekanoat, måste ge fullt skalutslag.

Parametrarna för toppens integration bör bestämmas på ett sådant sätt att en korrekt uppskattning av de ifrågavarande toppareorna erhålls.

**5.3. Analysförfarande**

Sug med hjälp av en mikrospruta på 10 µl upp 10 µl av lösningen. Dra tillbaka kolven tills nålen är tom. För in nålen i injektionssystemet och injicera snabbt efter 1–2 sekunder. Efter ca. 5 sekunder dras nålen försiktigt ut.

Utför registreringen tills alla vaxer eller stigmastadiener är helt eluerade, beroende på vilken fraktion som analyseras.

Baslinjen måste alltid uppfylla de fastställda villkoren.

**5.4. Identifiering av toppar**

Identifiera topparna utifrån retentionstiderna genom att jämföra dem med blandningar av vaxer med kända retentionstider analyserade under samma förhållanden. Alkylestrarna identifieras utifrån blandningar av etyl- och metylestrar av de viktigaste fettsyorna i olivoljor (palmitinsyra och oljesyra).

Figur 1 visar ett kromatogram för vaxer av jungfruolja. Figurerna 2 och 3 visar kromatogram för två extra jungfruoljor från detaljhandeln, den ena med metyl- och etylestrar och den andra utan. Figur 4 visar kromatogram för extra jungfruolja av bästa kvalitet och samma olja som tillsatts 20 % doftfri olja.

**5.5. Kvantitativ analys av vaxerna**

Bestäm de av toppareorna som motsvarar den interna standarden laurylarkinat och de alifatiska estrarna från C<sub>40</sub>–C<sub>46</sub> med hjälp av integratören.

Den totala vaxhalten bestäms som summan av de enskilda vaxerna i mg/kg fettämne, enligt följande:

$$\text{Vaxer, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

**▼ M23**

där:

$A_x$  = area motsvarande toppen för den enskilda estern, enligt elektronisk beräkning

$A_s$  = area motsvarande toppen för den interna standarden laurylarakinat, enligt elektronisk beräkning

$m_s$  = mängden intern standard laurylarakinat, i milligram

$m$  = vikt för provet som tagits ut för analys, i gram.

#### 5.5.1. Kvantitativ analys av metyl- och etylestrar

Bestäm med hjälp av integratorn de av toppareorna som motsvarar den interna standarden metylheptadekanoat, metylestrarna av  $C_{16}$  och  $C_{18}$ -fett-syror och etylestrarna av  $C_{16}$  och  $C_{18}$ -fettsyror.

Innehållet av varje enskild alkylester bestäms i mg/kg fettämne enligt följande:

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

där:

$A_x$  = area motsvarande toppen för den enskilda  $C_{16}$ - och  $C_{18}$ -estern, enligt elektronisk beräkning

$A_s$  = area motsvarande toppen för den interna standarden laurylarakinat, enligt elektronisk beräkning

$m_s$  = mängden intern standard metylheptadekanoat, i milligram

$m$  = vikt för provet som tagits ut för analys, i gram.

## 6. RESULTATREDOVISNING

Summan av de olika vaxinnehållen från  $C_{40}$  till  $C_{46}$  (Not 7) anges i mg/kg fettämnen.

Ange summan av innehållet metylestrar och etylestrar från  $C_{16}$  till  $C_{18}$  samt summan av de två produkterna.

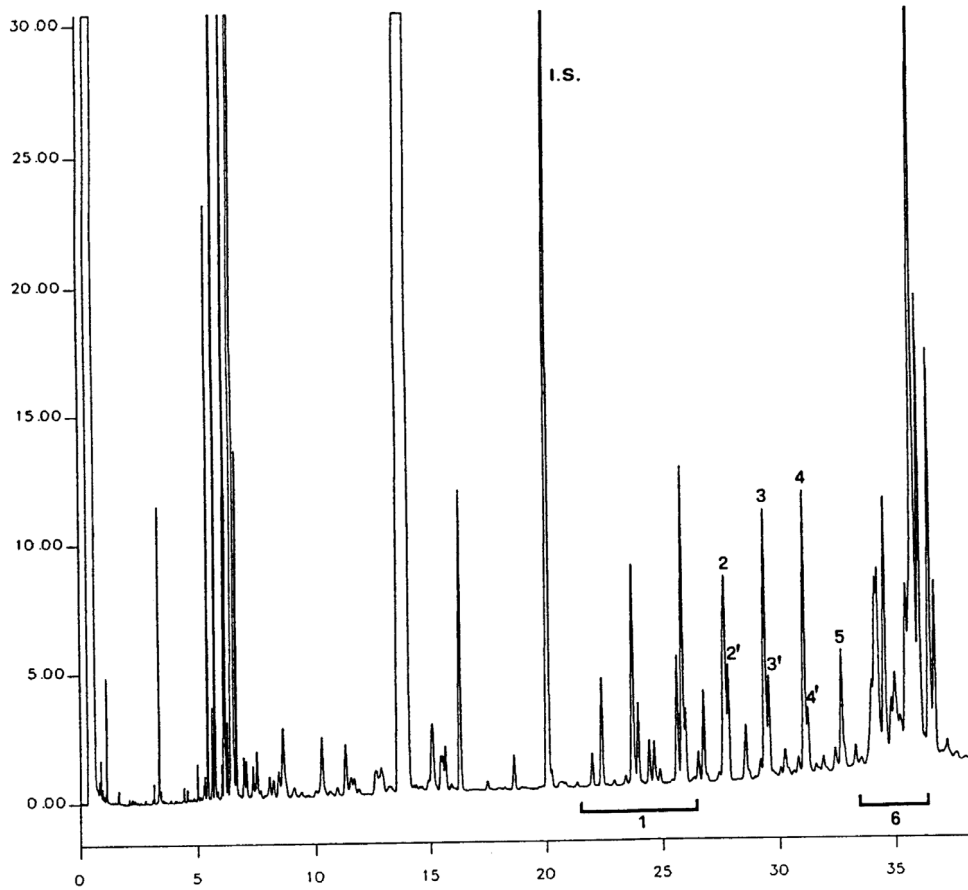
Resultaten bör uttryckas i närmaste mg/kg.

*Not 7: De komponenter som ska bestämmas kvantitativt är de med jämnt antal kolatomer bland  $C_{40}$  -  $C_{46}$ -estrar, jfr. exemplet på kromatogram för vaxer i olivolja i figuren nedan. Om  $C_{46}$ -estern är delad rekommenderas, för identifikationssyften, analys av vaxfraktionen i olivolja av pressrester där  $C_{56}$ -toppen tydligt kan urskiljas, då den är tydligt dominerande.*

Ange förhållandet mellan etylestrar och metylestrar

## ▼ M23

Figur 1

Exempel på ett gaskromatogram över en vaxfraktion i olivolja <sup>(1)</sup>

Toppar med en retentionstid på mellan fem och åtta minuter för metyl- och etylestrar i fettsyror.

Teckenförklaring:

I.S. = (intern standard) Laurylarakinat

1 = Diterpenestrar

2+2' = C<sub>40</sub>-estrar

3+3' = C<sub>42</sub>-estrar

4+4' = C<sub>44</sub>-estrar

5 = C<sub>46</sub>-estrar

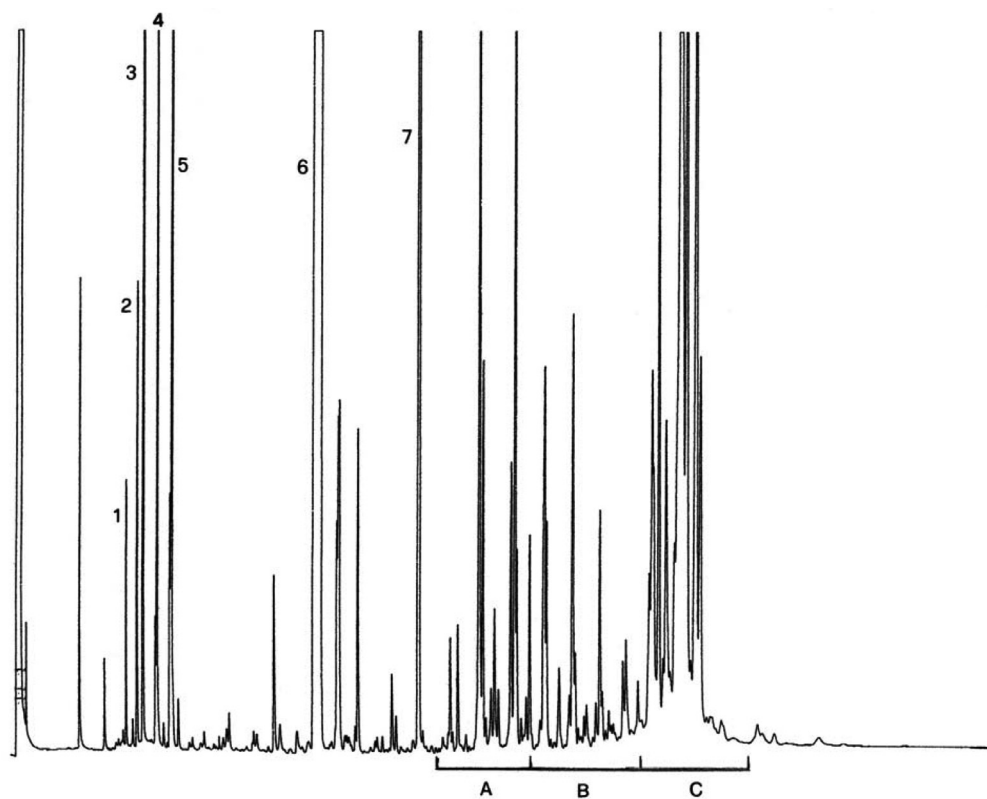
6 = Sterolestrar och triterpenestrar

<sup>(1)</sup> Efter eluering av sterolestrarna får kromatogrammet inte uppvisa några signifikanta toppar (triglycerider).

▼ M23

Figur 2

## Metylestrar, etylestrar och vaxer i jungfruolivolja



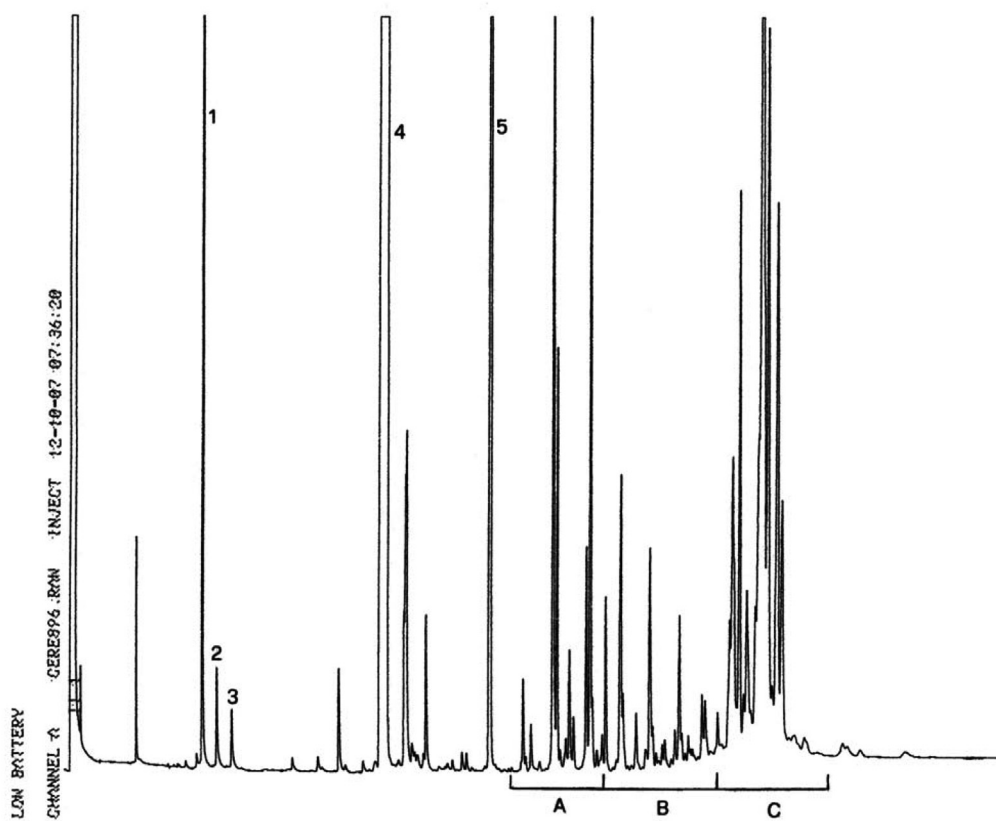
Teckenförklaring:

- 1 – Metyl C<sub>16</sub>
- 2 – Etyl C<sub>16</sub>
- 3 – Metylheptadekanoat (intern standard)
- 4 – Metyl C<sub>18</sub>
- 5 – Etyl C<sub>18</sub>
- 6 – Skvalen
- 7 – Laurylarakinat (intern standard)
- A – Diterpenestrar
- B – Vaxer
- C – Sterolestrar och triterpenestrar

## ▼M23

Figur 3

## Metylestrar, etylestrar och vaxer i extra jungfruolivolja



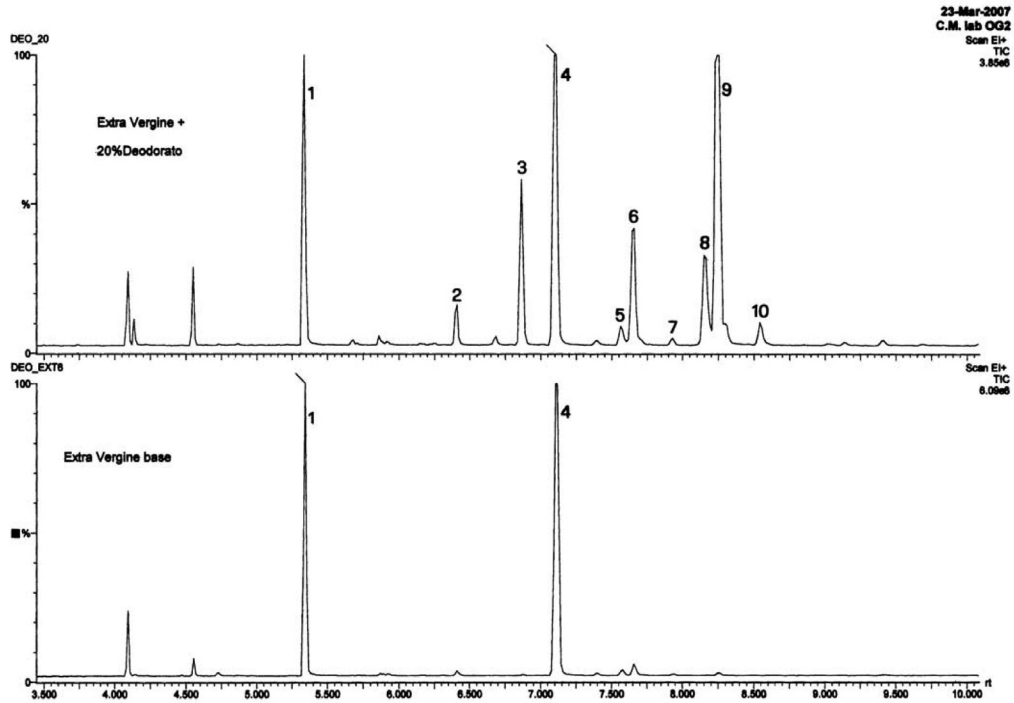
Teckenförklaring:

- 1 – Metylheptadekanoat (intern standard)
- 2 – Metyl C<sub>18</sub>
- 3 – Etyl C<sub>18</sub>
- 4 – Skvalen
- 5 – Laurylarakinat (intern standard)
- A – Diterpenestrar
- B – Vaxer
- C – Sterolestrar och triterpenestrar

## ▼ M23

Figur 4

Del av kromatogram över en extra jungfruolivolja och samma olja tillsatt med doftfri olja



Teckenförklaring:

- 1 – Metylmyristat (intern standard)
- 2 – Metylpalmitat
- 3 – Etylpalmitat
- 4 – Metylheptadekanoat (intern standard)
- 5 – Metylolinolatt
- 6 – Metyloleat
- 7 – Metylstearat
- 8 – Etylolinolat
- 9 – Etyloleat
- 10 – Etylstearat

**▼ M23***Tillägg A***Bestämning av gasens linjära hastighet**

Spruta in 1:3 µl metan (eller propan) i gaskromatografen efter att den ställts in till de normala driftförhållandena. Mät den tid det tar för gasen att gå igenom kolonnen, från det att den sprutas in tills toppen framgår (tM).

Den linjära hastigheten i cm/s anges som  $L/t_M$  där L är kolonnens längd i cm och tM är tiden i sekunder.

**▼ M28**

---

## BILAGA XXI

## Resultat av kontroller av överensstämmelse som utförs på olivolja enligt artikel 8.2

				Märkning						Kemiska parametrar			Organoleptiska egenskaper <sup>(4)</sup>			Slutsats	
Prov	Kategori	Ursprungsland	Inspektionsort <sup>(1)</sup>	Officiellt namn	Ursprungsbe-teckning	Lagrings-förhållan-den	Felaktig informa-tion	Läslighet	C/NC <sup>(3)</sup>	Parametrar utanför gränser J/N	Om ja, ange vilka <sup>(2)</sup>	C/NC <sup>(3)</sup>	Median-värde defekt	Median-värde fruktighet	C/NC <sup>(3)</sup>	Åtgärd som krävs	Påföljd

<sup>(1)</sup> Inre marknaden (press, tappningsföretag, detaljhandelsled), export, import.

<sup>(2)</sup> Varje egenskap hos olivolja som anges i bilaga I ska ha en kod.

<sup>(3)</sup> C/NC = uppfyller kraven/uppfyller inte kraven.

<sup>(4)</sup> Krävs inte för olivolja och olivolja av pressrester.