

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 796/2002

av den 6 maj 2002

om ändring av förordning (EEG) nr 2568/91 om egenskaper hos olivolja och olivolja av pressrester och om lämpliga analysmetoder och de kompletterande anmärkningarna i bilagan till rådets förordning (EEG) nr 2658/87 om tulltaxe- och statistiknomenklaturen och om Gemensamma tulltaxan

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT
DENNA FÖRORDNING

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets förordning nr 136/66/EEG av den 22 september 1966 om den gemensamma organisationen av marknaden för oljor och fetter ⁽¹⁾, senast ändrad genom förordning (EG) nr 1513/2001 ⁽²⁾, särskilt artikel 35a i denna,

med beaktande av rådets förordning (EEG) nr 2658/87 av den 23 juli 1987 om tulltaxe- och statistiknomenklaturen och om Gemensamma tulltaxan ⁽³⁾, senast ändrad genom kommissionens förordning (EG) nr 578/2002 ⁽⁴⁾, särskilt artikel 9 i denna, och

av följande skäl:

- (1) I kommissionens förordning (EEG) nr 2568/91 av den 11 juli 1991 om egenskaper hos olivolja och olivolja av pressrester och om lämpliga analysmetoder ⁽⁵⁾, senast ändrad genom förordning (EG) nr 2042/2001 ⁽⁶⁾, fastställs fysiska, kemiska och organoleptiska egenskaperna hos olivolja och olivolja av pressrester samt bedömningsmetoder för dessa egenskaper. Enligt den definition av kategorin rå olivolja av pressrester som fastställs i punkt 4 i bilagan till förordning nr 136/66/EEG skall vissa olivoljor av pressrester från och med den 1 november 2001, frånsett vissa fastställda egenskaper, jämföras med bomoljor.
- (2) I brist på en analytisk parameter som gör det möjligt att skilja mellan de bomoljor och de oljor som framställts genom centrifugering av pressrester, bör det för att särskilja dessa oljor och oberoende av framställningsmetod fastställas gränsvärden för sammansättningen beträffande vax, erytrodiol och uvaol eller av total alifatisk alkohol. Det bör därför fastställas en metod för fastställande av total alifatisk alkoholhalt.
- (3) Dessa nya gränsvärden kräver en ändring av den kompletterande anmärkningen 2 i kapitel 15 i den kombinerade nomenklaturen i bilaga I till förordning (EEG) nr 2658/87. Samtidigt bör artikel 5 och bilaga 14

till förordning (EEG) nr 2568/91 utgå och vissa fel åtgärdas som insmugit sig i den förordningen.

- (4) En harmonisering bör göras när det gäller de beredningsmetoder för prov av fettsyrametylestrar som används vid analys av oljornas fettsyrasammansättning. Den tekniska utvecklingen av analysmetoderna, och särskilt av dem som gäller bestämning av fria fettsyror, gör det möjligt att minska antalet metoder enligt gällande bilaga 10 B till två.
- (5) Mot bakgrund av de erfarenheter som samlats har Internationella olivoljerådet utarbetat en ny metod för bedömning av organoleptiska egenskaper hos jungfruolja. Denna metod är enklare och mer tillförlitlig än den som föreskrivs i bilaga 12 till förordning (EEG) nr 2568/91. Metoden enligt bilaga 12 bör alltså ersättas med den nya metoden för bedömning av organoleptiska egenskaper hos jungfruolja.
- (6) För tillämpning av den nya metoden för organoleptisk bedömning bör ett beslutsförfarande föreskrivas för de fall då den angivna kategorin inte överensstämmer med den kategori som fastställts av den panel som gjort bedömningen.
- (7) För att säkerställa att analyserna kan göras och med hänsyn till vissa regioners spridning bör olika tidsfrister föreskrivas för när prover efter provtagning skall skickas till laboratorium och som beaktar respektive årstids olika klimatförhållanden. För klassificeringen av oljor bör det anges att analysresultaten skall jämföras med de i förordning (EEG) nr 2568/91 föreskrivna gränserna, som redan tar hänsyn till de använda analysmetodernas marginaler för repeterbarhet och reproducerbarhet.
- (8) Dagen för denna förordnings ikraftträdande bör skjutas upp till den 1 september 2002, så att det under en övergångsperiod blir möjligt att gå över till de nya standarderna och införa de medel som krävs för att de skall kunna tillämpas och att det inte uppstår några störningar i handeln. Dessutom bör ett undantag medges för olivolja och olivolja av pressrester som före detta datum förpackats för detaljhandeln.
- (9) De åtgärder inom respektive kompetensområde som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från Förvaltningskommittén för oljor och fetter samt från Tullkodexkommittén.

⁽¹⁾ EGT 172, 30.9.1966, s. 3025/66.

⁽²⁾ EGT L 201, 26.7.2001, s. 4.

⁽³⁾ EGT L 256, 7.9.1987, s. 1.

⁽⁴⁾ EGT L 97, 13.4.2002, s. 1.

⁽⁵⁾ EGT L 248, 5.9.1991, s. 1.

⁽⁶⁾ EGT L 276, 19.10.2001, s. 8.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Förordning (EEG) nr 2568/91 ändras på följande sätt:

1. I artikel 2.1 skall:

a) tredje strecksatsen ersättas med följande:

”— För bestämning av vaxinnehållet, den metod som anges i bilaga 4.”,

b) följande strecksats läggs till:

”— För bestämning av alifatisk alkohol, den metod som anges i bilaga 19.”.

2. Artikel 2.2 skall ersättas med följande:

”2. Den granskning eller de kontrollundersökningar som nationella myndigheter eller representanter för dessa utför av de organoleptiska egenskaperna hos jungfruolja skall genomföras av paneler som godkänts av medlemsstaterna.

De organoleptiska egenskaperna hos en olivolja skall anses överensstämma med den angivna kategorin, om en panel som godkänts av den berörda medlemsstaten bekräftar denna klassificering.

Om den godkända panelen beträffande de organoleptiska egenskaperna inte bekräftar den kategori som angivits för olivoljan, skall de nationella myndigheterna eller deras företrädare, på begäran från den berörda parten, låta andra godkända paneler göra två kontrollundersökningar, varav minst en skall utföras av en panel som godkänts av den berörda producentmedlemsstaten. Egenskaperna skall anses överensstämma med de angivna, om bägge kontrollundersökningarna bekräftar den angivna klassificeringen. I annat fall skall olivoljedeklaranten stå för kostnader för kontrollundersökningar, utan att det påverkar tillämpningen av sanktioner.”.

3. Artikel 2.3 andra stycket skall ersättas med följande:

”Utan att det påverkar tillämpningen av standarden EN ISO 5555 och kapitel 6 i standarden EN ISO 661, skall proven skyndsamt skyddas mot ljus och höga temperaturer och skickas till laboratorieanalys senast

— tio arbetsdagar efter provtagning under perioden oktober–maj, och

— fem arbetsdagar efter provtagning under perioden juni–september.”.

4. I artikel 2 skall följande läggs till som punkt 5:

”5. För olivoljeegenskaper som fastställs med metoderna i punkt 1, skall analysresultaten direkt jämföras med de gränser som föreskrivs i den här förordningen.”.

5. Artiklarna 3 och 3a skall utgå.

6. Artikel 3b skall bli ny artikel 3.

7. Artikel 4.1 skall ersättas med följande:

”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.”.

8. Artikel 5 skall utgå.

9. Bilagorna skall ändras i enlighet med bilagan till den här förordningen.

Artikel 2

I kapitel 15 i Kombinerade nomenklaturen i bilaga I till förordning (EEG) nr 2658/87 skall kompletterande anmärkning 2 ändras på följande sätt:

1. I B.I skall a ersättas med följande:

”a) ett innehåll av vax av högst 300 mg/kg.”.

2. I B.I g skall punkt 4 ersättas med följande:

”4. Organoleptiska egenskaper som innefattar påvisbara defekter vars medianvärde är större än 6,0 enligt bilaga 12 till förordning (EEG) nr 2568/91.”.

3. I B.II skall g ersättas med följande:

”g) Organoleptiska egenskaper som innefattar påvisbara defekter vars medianvärde är mindre än eller lika med 6,0 enligt bilaga 12 till förordning (EEG) nr 2568/91.”.

4. I D skall b ersättas med följande:

”b) Ett innehåll av erytrodiol och uvaol som överskrider 4,5.”.

Artikel 3

Denna förordning träder i kraft den sjunde dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

För olivolja och olivolja av pressrester som förpackats för detaljhandeln skall den tillämpas från och med den 1 september 2002.

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

Utfärdad i Bryssel den 6 maj 2002.

På kommissionens vägnar

Franz FISCHLER

Ledamot av kommissionen

BILAGA

1. I sammanfattningen av bilagorna till förordning (EEG) nr 2568/91 skall följande läggas till:
 - a) Bilaga XIV: De kompletterande anmärkningarna 2, 3 och 4 i kapitel 15 i den kombinerade nomenklaturen skall utgå.
 - b) Följande rubrik skall läggas till: "Bilaga XIX: Metod för bestämning av halten alifatiska alkoholer."
2. Bilaga I skall ersättas med följande tabeller och text:

"BILAGA I

EGENSKAPER HOS OLIVOLJA

Kategori	Syra (%) (*)	Peroxidtal mqv O ₂ /kg (*)	Halogenerade lösningsmedel mg/kg (*) (1)	Vaxer mg/kg (**)	Mättade fettsyror i 2-ställning i triglycerider (%)	Stigmastadiener mg/kg (2)	Skillnad mellan ECN42 HPLC och ECN42 teoretisk beräkning	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	K ₂₇₀ efter behandling med aluminiumoxid (3)	Delta-K (*)	Organoleptisk bedömning Medianvärde för defekt (Md) (*)	Organoleptisk bedömning Medianvärde för fruktighet (Mf) (*)
1. Extra jungfruolja	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Jungfruolja	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Ordinär jungfruolja	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 6,0 (4)	—
4. Bomolja	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 300 (5)	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	—	Md > 6	—
5. Raffinerad olivolja	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—	—
6. Olivolja	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—	—
7. Rå olivolja av pressrester	> 0,5 (**)	—	—	> 350 (6)	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—	—
8. Raffinerad olivolja av pressresten	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—	—
9. Olivolja av pressrester	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—	—

(1) Övre gräns för totalhalten av halogenerade föreningar som påvisats med hjälp av elektronfärgningsdetektor.

För enskilda komponenter som påvisats är den övre gränsen 0,10 mg/kg.

(2) Summa isomerer som kan (eller inte kan) separeras i kapillärkolonn.

(3) I syfte att fastställa förekomst av raffinerad olja fastställs K₂₇₀ efter passage genom aluminiumoxid, om K₂₇₀ överstiger gränsen för den ifrågavarande kategorin.

(4) När medianvärdet för fruktighet är lika med 0 skall medianvärdet för defekt vara lägre än eller lika med 2,5.

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

(6) Olja med en sammanlagd vaxhalt på mellan 300 mg/kg och 350 mg/kg betraktas som rå olivolja av pressrester om den sammanlagda halten alifatiska alkoholer är högre än 350 mg/kg och om andelen erytrodiol och uvaol är högre än 3,5 %.

Kategori	Fettsyrasammansättning						Summa transolein-isomerer (%)	Summa translinol isomerer och translinolenisomerer (%)	Kolesterol (%)	Brassika-sterol (%)	Kampe-sterol (%)	Stigma-sterol (%)	Betasito-sterol (%) ⁽¹⁾	Delta-7-stigma-sterol (%)	Total-mängd steroler (mg/kg)	Erytrodiol och uvaol (%) ^(**)
	Myristin-syra (%)	Linolensyra (%)	Arakidin-syra (%)	Eikosen-syra (%)	Behensyra (%)	Lignocerin-syra (%)										
1. Extra jungfruolja	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Jungfruolja	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Ordinär jungfruolja	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
4. Bomolja	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽²⁾
5. Raffinerad olivolja	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Olivolja	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
7. Rå olivolja av pressrester	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽³⁾
8. Raffinerad olivolja av pressrester	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
9. Olivolja av pressrester	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Summan av: delta-5,23-stigmastadienol + chlosterol + betasitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadienol.

⁽²⁾ Olja med en sammanlagd vaxhalt på mellan 300 mg/kg och 350 mg/kg betraktas som bomolja om den sammanlagda halten alifatiska alkoholer är lägre än eller lika med 350 mg/kg eller om andelen erytrodiol och uvaol är lägre än eller lika med 3,5 %.

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

Anm.:

- Analysresultaten skall anges med samma antal signifikanta siffror som anges för varje egenskap. Den sista signifikanta siffran skall avrundas uppåt om efterföljande ej signifikant siffra är högre än 4.
- Det räcker med att en enda av egenskaperna avviker från de fastställda kriterierna för att en olja skall klassas i en annan kategori eller förklaras ej uppfylla kraven när det gäller renhet.
- Egenskaper markerade med asterisk (*) och som avser oljans kvalitet anger
 - för bomolja, att samtliga gränsvärden (med undantag av K₂₃₂) inte behöver vara samtidigt uppfyllda,
 - för övriga jungfruoljor, att om minst ett av dessa gränsvärden inte är uppfyllt måste oljan byta kategori, men förblir dock klassad inom en kategori inom en kategori för jungfruolja.
- Egenskaper markerade med två asterisk (**) anger, för all olivolja av pressrester, att samtliga gränsvärden inte behöver vara samtidigt uppfyllda."

3. Bilaga X.B skall ersättas med följande bilaga:

"BILAGA X B

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

Följande två metoder rekommenderas för beredning av metylestrar av fettsyror från olivolja och olivolja av pressrester.

Metod A: Transesterifiering vid låg temperatur i en metanollösning av kaliumhydroxid.

Metod B: Metylering vid hög temperatur i en metanollösning av natriummetylat följd av esterifiering i sur miljö.

Valet av metod beror på vilken analytisk parameter som skall bestämmas och på kategori av olja, som anges nedan:

- a) Bestämning av skillnaden mellan faktisk och teoretisk halt av triglycerider med ECN42 (Δ ECN42):
- Metod A tillämpas på prov av oljor av alla kategorier efter det att oljan renats genom att passera en kiselgelkolonn.
- b) Bestämning av fettsyresammansättning:
- Metod A tillämpas direkt på prov av olja av följande kategorier:
 - Jungfruolja med en halt av fria fettsyror lägre än 3,3 %.
 - Raffinerad olivolja.
 - Olivolja (blandning av jungfruolja och raffinerad olivolja).
 - Raffinerad olivolja av pressrester.
 - Olivolja av pressrester (blandning av jungfruolja och raffinerad olivolja av pressrester).
 - Metod B tillämpas direkt på prov av olja av följande kategorier:
 - Jungfruolja med en halt av fria fettsyror högre än 3,3 %.
 - Oraffinerad olivolja av pressrester.
- c) Bestämning av transisomerer av fettsyror:
- Metod A tillämpas direkt på prov av olja av följande kategorier:
 - Jungfruolja med en halt av fria fettsyror lägre än 3,3 %.
 - Raffinerad olivolja.
 - Olivolja (blandning av jungfruolja och raffinerad olivolja).
 - Raffinerad olivolja av pressrester.
 - Olivolja av pressrester (blandning av jungfruolja och raffinerad olivolja av pressrester).
 - Metod B tillämpas på prov av oljor av följande kategorier efter det att oljan renats genom att passera en kiselgelkolonn:
 - Jungfruolja med en halt av fria fettsyror högre än 3,3 %.
 - Oraffinerad olivolja av pressrester.

RENING AV OLJEPROV

Vid behov renas proven genom att oljan får passera en kiselgelkolonn, i en lösning av hexan och dietyler (87:13 v/v) enligt metod IUPAC 2.507.

Alternativt görs en extraktion med fast fas i kiselgelpatron. Placera en kiselgelpatron (1 g, 6 ml) i en apparat för eluering i vakuum och skölj med 6 ml hexan. Bryt vakuuemet för att undvika att kolonnen torkar. Tillför olja (circa 0,12 g) löst i 0,5 ml hexan i kolonnen, sätt den under vakuum så att lösningen tränger in i kiselgelen och eluera sedan med 10 ml hexan/dietyler (87:13 v/v) under vakuum. 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.

METODER FÖR BEREDNING AV METYLESTRAR AV FETTSYROR

1. **Metod A: Transesterifiering vid låg temperatur i en metanollösning av kaliumhydroxid**

1.1 **Tillämpning**

Denna snabba metod tillämpas på olivolja och olivolja av pressrester med en halt av fria fettsyror som är lägre än 3,3 %. De fria fettsyrorerna esterifieras inte av kaliumhydroxid. Etylestrar av fettsyror transesterifieras inte lika snabbt som glyceridestrar och det är möjligt att de metyleras endast delvis.

1.2 Princip

Metylestrar bildas genom transesterifiering i en metanollösning av kaliumhydroxid som en mellanprodukt före förtvålning (punkt 5 i metod ISO 5509:2000, punkt 5 i metod IUPAC 2.301).

1.3 Reagens

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

Heptan för kromatografi.

Kaliumhydroxid i metanollösning, cirka 2 N: lös 11,2 g kaliumhydroxid i 100 ml metanol.

1.4 Utrustning

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

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

1.5 Utförande

Mät upp cirka 0,1 g av oljeprovet i ett 5 ml provrör med skruvkork. Tillsätt 2 ml heptan och skaka. Tillsätt 0,2 ml 2 N metanollösning av kaliumhydroxid, tillslut väl med en kork försedd med teflonpackning och skaka kraftigt i 30 sekunder. Låt provröret stå tills lösningens övre skikt har klarnat. Håll 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 skall ske. Lösningen bör ej stå längre tid än tolv timmar.

2. Metod B: Metylering vid hög temperatur i en metanollösning av natriummetylat följd av esterifiering i sur miljö**2.1 Tillämpning**

Denna metod tillämpas på olivolja och olivolja av pressrester med en halt av fria fettsyror som är högre än 3,3 %.

2.2 Princip

Neutralisering av fria fettsyror och alkalisk metanolys av glycerider, följt av esterifiering av fria fettsyror i sur miljö (punkt 4.2 i metod IUPAC 2.301).

2.3 Reagens

- Heptan för kromatografi.
- Metanol med en vattenhalt som inte överstiger 0,05 % (m/m).
- Natriummetylat i metanollösning, 0,2 N: lös 5 g natrium i 1000 ml metanol (kan beredas av lösningar som finns i handeln).
- Fenolftalein, 0,2-procentig lösning i metanol.
- Svavelsyra, 1 N metanollösning: tillsätt 3 ml 96-procentig svavelsyra i 100 ml metanol.
- Mättad vattenlösning av natriumklorid.

2.4 Utrustning

- 50 ml flatbottnad mätkolv med lång, smal och slipad hals.
- Återflödeskylare. Luftkylare (1 m lång) med slipad anslutningsfog.
- Kokstenar.
- Glastratt.

2.5 Utförande

För över 0,25 g av oljeprovet i en 50 ml mätkolv med slipad hals. Tillsätt med hjälp av tratten 10 ml 0,2 N metanollösning av natriummetylat och kokstenar. Anslut återflödeskylaren, skaka och värm till kokning. Lösningen bör klarna efter cirka tio minuter. Reaktionen är praktiskt taget avslutad efter 15 minuter. Ta bort kolven från värmen, vänta tills återflödet har avstannat, ta bort kylaren och tillsätt två droppar fenolftaleinlösning. Tillsätt några milliliter 1 N svavelsyra i metanollösningen tills den blir färglös, och tillsätt sedan ytterligare 1 ml. Anslut kylaren och låt på nytt koka i cirka 20 minuter. Ta bort kolven från värmen och kyl den under rinnande vatten. Ta bort kylaren, tillsätt 20 ml mättad natriumkloridlösning och skaka. Tillsätt 5 ml heptan, tillslut kolven och skaka kraftigt i 15 sekunder.

Låt innehållet klarna tills de två faserna är fullständigt separerade. Tillsätt på nytt mättad natriumkloridlösning till dess att vattenfasen når nedre delen av kolvens hals. Det övre skiktet som innehåller metylestrar befinner sig i kolvens hals. Den erhållna lösningen är färdig att injiceras i gaskromatografen.

Varning: Metylering med metod B skall göras i dragskåp.

2.6 Alternativ till metylering enligt metod B

2.6.1 Metod C

2.6.1.1 Princip

Det fett som skall analyseras behandlas med en metanollösning av väteklorid i en sluten behållare vid 100 °C.

2.6.1.2 Utrustning

- Stark glasbehållare med cirka 5 ml volym (höjd 40–45 mm, diameter 14–16 mm).
- Mätpipetter, 1 och 2 ml.

2.6.1.3 Reagens

Saltsyralösning i 2-procentig metanol, bereds av gasformig väteklorid och vattenfri metanol (anm. 1).

Hexan för kromatografi.

Anm.: I handeln finns färdigberedda lösningar av väteklorid i metanol som kan användas. I laboratoriet är det lätt att bereda små kvantiteter av gasformig väteklorid genom att den köpta lösningen ($d=1,18$) försätts med några droppar koncentrerad svavelsyra. Eftersom väteklorid löses mycket snabbt i metanol, är det lämpligt att vidta brukliga försiktighetsåtgärder när den skall lösas (exempelvis att tillföra gasen med hjälp av liten omvänd tratt som når just till metanolens yta. Större mängder väteklorid i metanollösning kan beredas i förväg och håller sig bra om lösningen förvaras mörkt i kolvar med glaspropp. Detta reagens kan också beredas genom att acetylklorid löses i vattenfri metanol.

2.6.1.4 Utförande

- Till glasbehållaren överförs 0,2 g fett som torkats på natriumsulfat och filtrerats och därefter 2 ml metanollösning av saltsyra. Tillslut behållaren.
- Låt behållaren stå i vattenbad (100 °C) i 40 minuter.
- Kyl behållaren under rinnande vatten, öppna den och tillsätt 2 ml destillerat vatten och 1 ml hexan.
- Centrifugera och isolera hexanfasen, som är färdig att använda.

2.6.2 Metod D

2.6.2.1 Princip

Det fett som skall analyseras värms under återflöde med metanol, hexan och svavelsyra. De erhållna metylestrarna extraheras med petroleumeter.

2.6.2.2 Utrustning

- Provrör med cirka 20 ml volym anslutet till en cirka 1 m lång återflödeskylare för luft med slipad anslutningsfog.
- Mätpipett, 5 ml.
- Separertratt, 50 ml.
- Bägare, 10 ml och 25 ml.
- Provrör med konisk botten, 15 ml.

2.6.2.3 Reagens

- Metyleringsreagens: vattenfri metanol, hexan och koncentrerad svavelsyra ($d = 1,84$) i förhållandet 75:25:1 (v/v/v).

- Petroleumeter 40–60 C.
- Vattenfritt natriumsulfat.

2.6.2.4 Utförande

Häll 0,1 g olja i ett 20 ml provrör och tillsätt 5 ml metyleringsreagens.

Anslut återflödeskylaren och värm i vattenbad till kokning i 30 minuter (not 2).

Överför blandningen kvantitativt till en 50 ml separertratt med 10 ml destillerat vatten och 10 ml petroleumeter. Skaka kraftigt och låt faserna separera. Skilj av vattenfasen och skölj eterskiktet två gånger med 20 ml destillerat vatten. Tillsätt i separertratten en liten mängd vattenfritt natriumsulfat, skaka, låt stå några minuter, filtrera sedan och samlar upp filtratet i ett 15 ml provrör med konisk botten.

Indunsta lösningsmedlet på ett vattenbad i en ström av kväve.

Anm. För att styra kokningen, sätt in en glasstav i provröret och ställ in temperaturen på vattenbadet på 90 C.

3. **Precisionsparametrar**

En statistisk utvärdering av noggrannheten hos metod A och B har publicerats av Internationella olivoljerådet i metod COI/T.20/Doc. nr 24.

REKOMMENDATIONER FÖR ANALYS MED GASKROMATOGRAFI AV FETTSYREESTRAR AV OLIVOLJA OCH OLIVOLJA AV PRESSRESTER

1. **Utförande**

Analys med gaskromatografi av lösningar av fettestrar i hexan skall göras i enlighet med norm ISO 5508, med hjälp av en kapillärkolonn (50 m lång och med en inre diameter på 0,25 eller 0,30 mm) täckt med cyanopropylsilikon, som anges för bestämning av transomerer av fettsyror (COI/T.20/Doc. nr 17).

I figur 1 visas en typisk kromatografisk profil av en olivolja av pressrester som innehåller metyl- och etylestrar av fettsyror och transomerer av metylestrar.

2. **Beräkningar**

2.1 Vid beräkning av fettsyresammansättning och ΔECN42 skall följande fettsyror beaktas:

Myristinsyra (C14:0).

Palmitinsyra (C16:0). Total area av de toppar som motsvarar metyl- och etylestrar.

Palmitinoljesyra (C16:1). Total area av de toppar som motsvarar isomererna ω9 och ω7 av metylester.

Heptadekansyra (C17:0).

Heptadekensyra (C17:1).

Stearinsyra (C18:0).

Oljesyra (C18:1). Total area av de toppar som motsvarar isomererna ω9 och ω7 av metylester, etylester och transomerer av metylester.

Linolsyra (C18:2). Total area av de toppar som motsvarar isomererna ω9 och ω7 av metyl- och etylestrar samt transomerer av metylester.

Arakidinsyra (C20:0).

Linolensyra (C18:3). Total area av topparna för metylester och transomerer av metylester.

Gadoljesyra (C20:1).

Behensyra (C22:0).

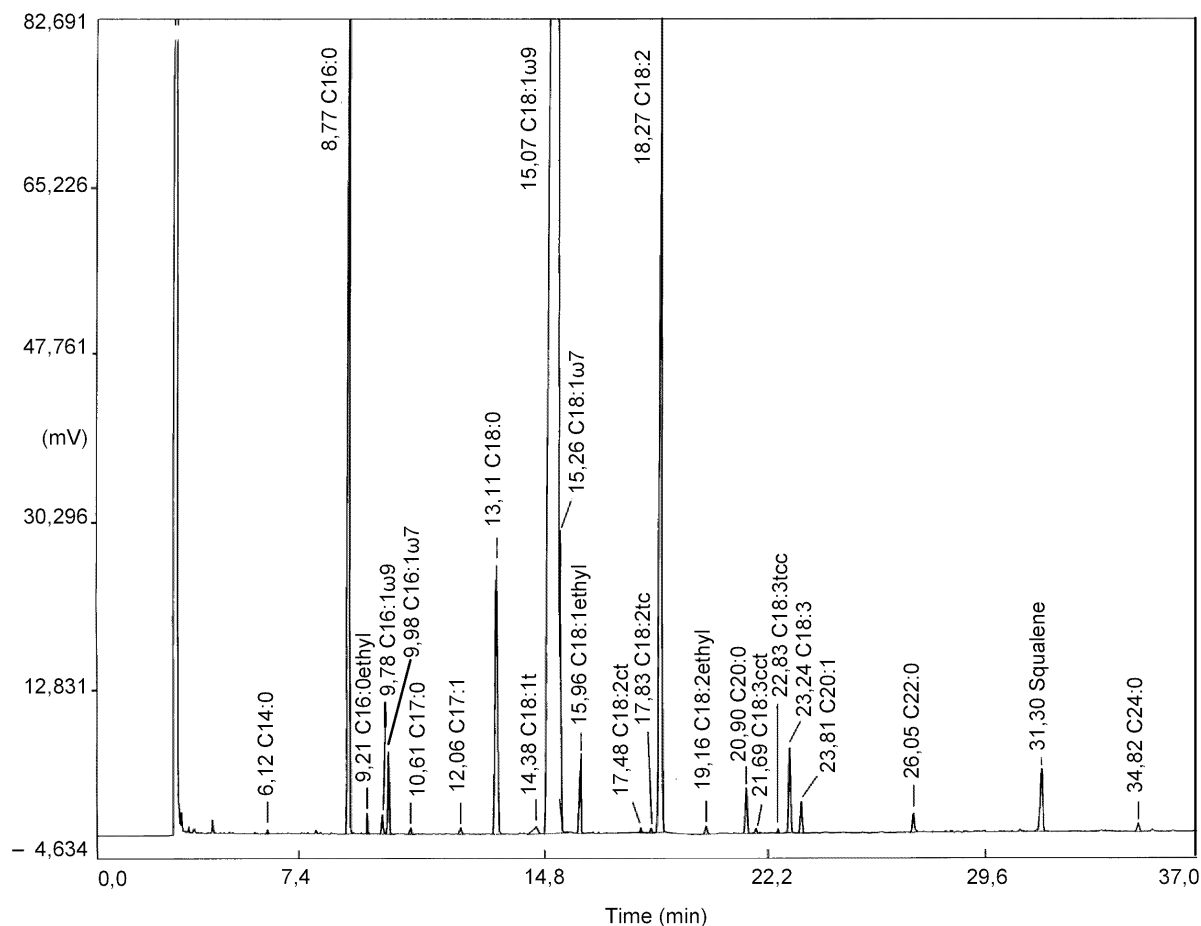
Lignocerinsyra (C24:0).

Skvalen beaktas inte vid beräkning av den totala arean.

2.2 Vid beräkning av procenttalet för trans-C18:1 används den topp som motsvarar metylestrarna av denna fettsyra. Vid beräkning av summan (trans-C18:2 + trans-C18:3) adderas alla toppar som motsvarar transomererna av dessa båda fettsyror. Vid beräkning av den totala arean beaktas alla de toppar som nämns i punkt 2.1 (se COI/T.20/Doc. Nr 17).

Procenttalet för varje enskild fettsyra beräknas enligt följande formel:

$$\% X = (\text{area } X \times 100) / (\text{total area})$$



Figur 1: Kromatografisk profil för en olivolja av pressrester, erhållen genom metoden för metylering vid låg temperatur. De kromatografiska topparna motsvarar metylestrar om inget annat anges.

4. Bilaga XII skall ersättas med följande bilaga:

"BILAGA XII

ORGANOLEPTISK VÄRDERING AV JUNGFRUOLJA

1. SYFTE OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Avsikten med denna metod är att bestämma de kriterier som krävs för att värdera organoleptiska egenskaper hos jungfruolja i enlighet med punkt 1 i bilagan till förordning nr 136/66/EEG och att beskriva hur de skall klassificeras i detta avseende.

Det angivna förfarandet är bara tillämpligt för klassificering av jungfruolja med avseende på förekomsten av fruktighet och på hur intensiva defekterna är, vilket fastställts av en utvald grupp utbildade provsmakare, som utgör en panel i enlighet med punkt 4.

2. ALLMÄNT

För allmän grundläggande terminologi, lokal, allmän metodik och glas för provsmakning av olivolja rekommenderas användning av Internationella olivoljerådets föreskrifter.

3. SPECIELL TERMINOLOGI

3.1 Positiva egenskaper

Fruktig: Total doftupplevelse, beroende på olivsort och egenskaper hos oljan från frisk, färsk frukt, grön eller mogen, som upplevs direkt eller retronasalt.

Bitter: Karaktäristisk smak hos oljor som erhållits av gröna oliver eller oliver som börjar ändra färg.

Stark: Stickande intryck, karaktäristisk för olja som framställts i början säsongen, främst från ännu gröna oliver.

3.2 **Negativa egenskaper**

Unken: Karakteristisk doft och smak hos olja från ihopsamlade oliver i långt framskriden anaerob jäsning.

Möglig-fuktig: Karakteristisk doft och smak hos oljor som framställts av oliver där svamp och jäst har utvecklats, beroende på att de lagrats under fuktiga förhållanden i flera dagar.

Gyttig fällning: Karakteristisk doft och smak hos oljor som varit i kontakt med dekanterad fällning i fat och underjordiska tankar.

Vin-vinäger: Karakteristisk doft och smak hos vissa oljor som påminner om vin eller vinäger. Beror i allmänhet på bildningen av ättiksyra, etylacetat och etanol vid olivernas jäsning.

Metallisk: Doft och smak som påminner om metall. Karakteristisk för oljor som har varit i längre kontakt med metalliska ytor under krossning, blandning, pressning eller förvaring.

Härsken: Doft och smak hos oljor som har genomgått en oxideringsprocess.

Värmt eller bränt: Karakteristisk doft och smak hos oljor som orsakas av för hög och/eller för långvarig uppvärmning under framställningen, i synnerhet när massan blandas termiskt om detta sker under olämpliga förhållanden.

Hö-trä: Karakteristisk doft och smak hos vissa oljor från torkade oliver.

Rå: Tjock och mosig smakupplevelse hos vissa oljor.

Fett: Doft och smak som påminner om diesel, fett eller mineralolja.

Grönsaksvatten: Doft och smak som uppstår på grund av längre kontakt med grönsaksvatten.

Saltlake: Doft och smak av olja som framställts av oliver som konserverats i saltlösning.

Esparto: 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 espartogräs eller torkat espartogräs.

Jordig: Karakteristisk doft och smak hos oljor som framställts av oliver som har insamlats med jord eller gytta på dem och inte tvättats.

Maskig: Karakteristisk doft och smak hos oljor från oliver som har varit utsatta för kraftiga attacker av larver från olivflugan (*Bactrocera Oleae*).

Gurka: Karakteristisk doft och smak som uppstår när en olja är hermetiskt förpackad alltför länge, särskilt i plåtbehållare, och som anses bero på bildningen av 2,6 nonadienal.

4. **PANEL**

Panelen skall utses av medlemsstaten och bestå av en ordförande och åtta till tolv provsmakare. För regleringsåret 2001/2002 kan dock antalet provsmakare vara färre än åtta.

Panelens ordförande måste vara en välutbildad expert på olika typer av olivolja. Han ansvarar för panelen, dess organisation och funktion, för förberedande, kodning och presentation av proverna för provsmakarna samt för insamling av data och statistisk bearbetning.

Panelens ordförande skall välja ut provsmakarna och ansvara för deras utbildning samt för kontroll av deras arbete för att säkerställa att de motsvarar de krav som ställs.

De provsmakare som skall utföra de organoleptiska kontrollerna av olivolja skall väljas ut och utbildas med avseende på sin förmåga att skilja mellan liknande prov, i enlighet med vägledningen från Internationella olivoljerådet beträffande urval, utbildning och kontroll av kvalificerade provsmakare av jungfruolja.

Panelerna skall åta sig att delta i organoleptiska bedömningar som föreskrivs på nationell nivå, gemenskapsnivå eller internationell nivå för återkommande kontroll och samordning av bedömningskriterier. De skall dessutom årligen underrätta medlemsstaten om panelens sammansättning och om hur många bedömningar den godkända panelen har gjort.

5. **FÖRFARANDE FÖR ORGANOLEPTISK UTVÄRDERING OCH KLASSIFICERING**

5.1 **Provsmakarnas användande av profilformuläret**

Det profilformulär som provsmakarna skall använda återfinns i tillägg A till denna metodredogörelse.

Varje provsmakare som ingår i panelen skall först lukta på och därefter provsmaka ⁽¹⁾ den aktuella oljan i ett provsmakningsglas för att analysera smak- och luktintryck samt taktila och kinestetiska intryck. Han skall i profilformuläret ange hur intensivt han upplever de olika negativa och positiva egenskaperna.

Om provsmakaren upplever negativa egenskaper som inte återfinns i profilformuläret, skall dessa anges under rubriken 'övrigt', med användande av den eller de termer i punkt 3.2 i denna metodredogörelse som så exakt som möjligt beskriver dem.

5.2 Panelordförandens användande av data

Panelens ordförande skall samla in provsmakarnas ifyllda formulär och kontrollera de intensiteter som angivits. Om en avvikelse föreligger, skall han anmoda provsmakaren att se över sitt profilformulär, och vid behov göra om testet.

Panelens ordförande kan föra in uppgifterna från varje provsmakare i ett datorprogram i enlighet med den i tillägg B angivna metoden för statistisk beräkning av medianvärdet. Uppgifterna för varje prov skall föras in i en matris bestående av tio kolumner som motsvarar de tio egenskaperna och av n rader som motsvarar panelens n provsmakare.

Om minst 50 % av panelen anger en negativ egenskap under rubriken 'övrigt', skall panelens ordförande beräkna medianvärdet för denna egenskap och för den motsvarande klassificeringen.

När det gäller de analyser som gjorts vid kontrollen av att normerna är uppfyllda, eller vid kontrollundersökningar, skall panelens ordförande låta genomföra en trefaldig organoleptisk bedömning av oljan, med intervaller på minst en dag. Medianvärdet för egenskaperna skall beräknas utifrån samtliga uppgifter i profilformulären för de tre undersökningarna.

5.3 Klassificering av oljor

Oljan skall klassificeras enligt följande benämningar, med defekternas och fruktighetens medianvärde som utgångspunkt. Med defekternas medianvärde avses medianvärdet för den mest intensiva negativa egenskapen. En robust variationskoefficient för den negativa egenskapen skall vara högst 20 %.

- a) *Extrajungfruolja*: Defekternas medianvärde är lika med 0 och medianvärdet för fruktighet är större än 0.
- b) *Jungfruolja*: Defekternas medianvärde är större än 0 och mindre än eller lika med 2,5 och medianvärdet för fruktighet är större än 0.
- c) *Ordinär jungfruolja*: Defekternas medianvärde är större än 2,5 och mindre än eller lika med 6,0. Alternativt: medianvärdet är mindre än eller lika med 2,5, och medianvärdet för fruktighet är lika med 0.
- d) *Jungfrubomolja*: Defekternas medianvärde är större än 6,0.

Fr.o.m. den 1 november 2003 skall dock kategorierna c och d ersättas med följande kategori:

- c) *Bomolja*: Defekternas medianvärde är större än 2,5. Alternativt: defekternas medianvärde är mindre än eller lika med 2,5 och medianvärdet för fruktighet är lika med 0.

5.4 Särskilda fall

Om medianvärdet överstiger 5,0 för en annan positiv egenskap än fruktig, skall panelens ordförande ange detta på analysintyget för oljan.

⁽¹⁾ Han får avstå från att provsmaka, om han noterar extremt intensiva negativa egenskaper och han skall då anteckna detta exceptionella förhållande i profiltabellen.

TILLÄGG A

Profilformulär

(skall användas av provsmakaren)

BEDÖMNING AV DEFEKTERNA

INTENSITET

Unken	----->
Möglig-fuktig	----->
Vin-vinäger	----->
Gyttig fällning	----->
Metallisk	----->
Härsken	----->
Övrigt, skall specificeras	----->

BEDÖMNING AV POSITIVA EGENSKAPER

Fruktig	----->
Bitter	----->
Stark	----->

Provsmakarens namnProvets koddatum

TILLÄGG B

METOD FÖR BERÄKNING AV MEDIANVÄRDE OCH KONFIDENSINTERVALL

Medianvärde

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

Medianvärdet är det reella tal, X_m , som kännetecknas av att sannolikheten (P) att värdena inom fördelningen (X) är lägre än (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. Enligt en annan definition utgör medianvärdet den 50:e percentilen av en uppsättning tal som ordnats i stigande ordning. Medianvärdet är med andra ord centralvärdet i en ordnad serie om antalet tal är ojämnt, eller medelvärdet av de två centralvärdena i en ordnad serie om antalet tal är jämnt.

Robust standardavvikelse

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

För att få en tillförlitlig uppskattning av spridningen kring medianvärdet används Stuarts och Kendalls metod för uppskattning av robust standardavvikelse. I formeln är den asymptotiska standardavvikelsen S beroende av N och IQR. N är antalet observationer och IQR är kvartilavståndet, dvs. en robust uppskattning av spridningen hos uppgifterna i fråga (kvartilavståndet omfattar exakt 50 % av elementen i en given sannolikhetsfördelning). Kvartilavståndet erhålls genom beräkning av skillnaden mellan den 75:e och den 25:e percentilen.

$$\text{IQR} = 75\text{:e percentilen} - 25\text{:e percentilen}$$

Percentilen är det värde X_{pc} för vilket sannolikheten (P) att fördelningens värden är lägre än X_{pc} är lägre än eller lika med ett visst decimalvärde, samtidigt som sannolikheten (P) att fördelningens värden är större än eller lika med X_{pc} är större än eller lika med detta decimalvärde. Decimalvärdet anger vilken del av fördelningen 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 med andra ord 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.

Robust variationskoefficient %

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

CVR är ett rent tal, dvs. det anger inte enheter utan utgör ett mått på talseriens spridning som procentandel av medianvärdet Me. Denna koefficient är mycket användbar som ett mått på panelmedlemmarnas tillförlitlighet.

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 ligga, 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.

$$\text{I. C. (övre)} = Me + (c.S)$$

$$\text{I. C. (nedre)} = Me - (c.S)$$

Där c är lika med 1,96 för konfidensintervall på 0,95.

Klassificeringen görs genom att medianvärdena jämförs med de referensintervall som fastställs i punkt 5.3 i metodredogörelsen. Genom programvaran kan klassificeringen visas grafiskt eller i en tabell över statistiska uppgifter.:

5. Bilaga XIV skall utgå.
6. Följande skall läggas till som bilaga XIX:

"BILAGA XIX

BESTÄMNING AV HALTEN ALIFATISKA ALKOHOLER MED KAPILLÄRGASKROMATOGRAFI

1. SYFTE
Förfarandet beskriver en metod för bestämning av halten alifatiska alkoholer, enskilt eller totalt, i oljor och fetter.
2. PRINCIP
Fettämnet med 1-ecosanol tillsatt som standard, förtvålas 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 trimetylsilyleter 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 Kompletta 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 vakuumbolv.
 - 3.8 50 ml vakuumbolv 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 termostat-kammare 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).
4. REAGENSER
 - 4.1 Kaliumhydroxid, cirka 2 N etanol-lösning: 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, circa 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.
- 4.11 Referenslösning för tunnskikt-kromatografi: kolesterol eller fytosterol, 5 % lösning i kloroform.
- 4.12 2,7-diklorfluorecin, 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 trimetylsilyletrar av alifatiska alkoholer från C₂₀ till C₂₈. Framställs av blandningar av rena alkoholer omedelbart innan de skall användas.
- 4.17 En 0,1 % (m/v) lösning av 1-eicosanol i CHCl₃ (inre standard).
- 4.18 Bärgas: väte eller helium, ren för gaskromatografi.
- 4.19 Suppleterande gaser: kväve, ren för gaskromatografi.

5. UTFÖRANDE

5.1 Preparering av oförtvålbare ämnen

- 5.1.1 Inför med hjälp av en 500 µl spruta i en 250 ml rundkolv en volym av 0,1 % 1-eicosanollösning (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.

- 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 oförtvåbara 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 (*).

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.

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 nedre kant. 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.

- 5.2.5 Plattan sprayas lätt och jämnt med en lösning av 2,7-diklorfluorescein. När plattan betraktas i ultraviolettt ljus kan de alifatiska alkoholernas band identifieras genom att det ligger i höjd med fläcken som har erhållits från referenslösningen. De alifatiska alkoholernas band.

Anm. 4: Kravet för grupperingen av de alifatiska alkoholernas band och triterpenalkoholernas band tillsammans bestäms av den möjliga övergången av en del alifatiska alkoholer i triterpenalkoholbandet.

- 5.2.6 Skrapa med hjälp av en metallspatel bort silicagelen på det markerade området. Placera det finfördelade materialet som tagits bort i filtertratten (3.7). Tillsätt 10 ml het kloroform, rör försiktigt med metallspateln och filtrera i vakuum-E-kolven (3.8) som är ansluten till filtertratten.

Tvätta återstoden i kolven tre gånger med etyleter (cirka 10 ml varje gång) och samla filtratet i samma kolv som är ansluten till filtertratten. Indunsta filtratet till en volym på 4 till 5 ml, överför lösningen till ett vägt 10 ml provrör (3.9), indunsta till torrhet genom lätt uppvärmning i ett försiktigt flöde av kvävgas, 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 vägt det.

Återstoden i provröret består av alkoholfraktionen.

5.3 Beredning av trimetylsilyleterar

- 5.3.1 Reagensen för silyleringen, som består av en blandning av 9:3:1 räknat per volym (*anm. 5*) av pyridinhexametyldisilazan-trimetylklorosilan i förhållandet 50 µl för varje mg alkoholer tillsätts till provröret som innehåller alkoholfraktionen, varvid ingen fukt får absorberas (*anm. 6*).

Anm. 5: Lösningar som är klara för användning kan köpas färdiga. Dessutom finns också andra silaniseringsreagenser som t.ex. bis-trimetylsilyl, trifluoroacetamid + 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.

(*) I särskilda fall måste 95:5 (v/v) bensen/acetonblandning användas för att få en god separation av banden.

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 registreringssystem 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:

- kolonntemperatur: 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,
- 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 ± 5 minuter,
- toppen för alkoholen C_{22} skall vara 80 ± 20 % av hela skalvärdet för olivolja och 40 ± 20 % av hela skalvärdet för fröolja.

5.4.2.2 Att de tidigare nämnda kraven är uppfyllda kontrolleras genom en upprepad 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.

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.

Ett kromatogram av alkoholfraktionen av en jungfruolja visas i figur 1.

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

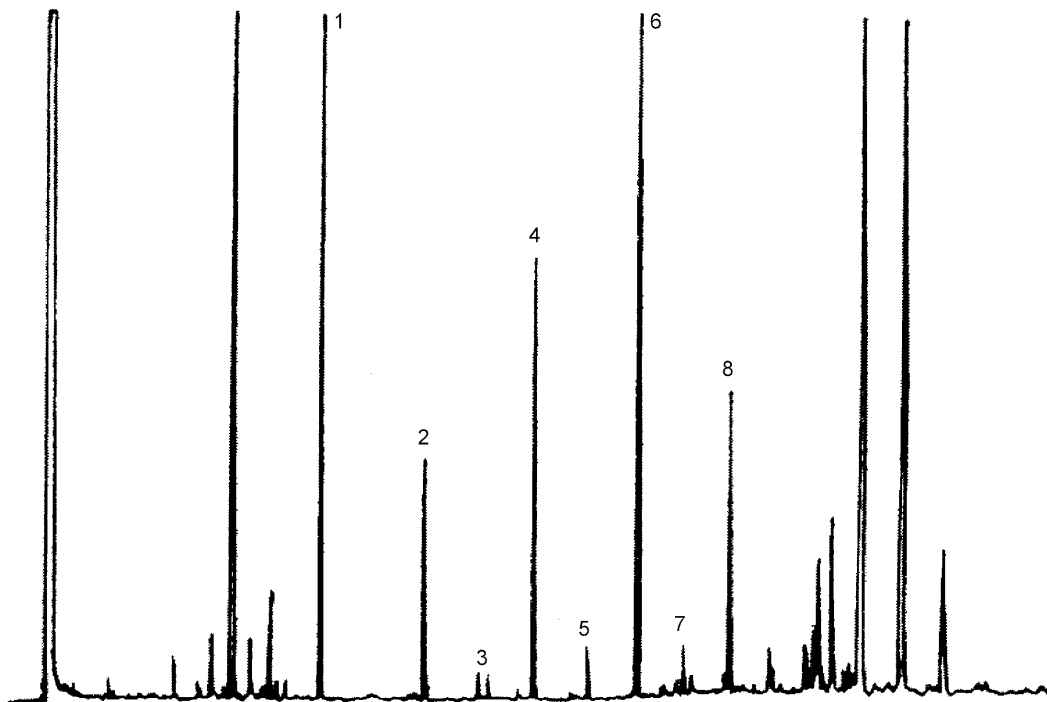
Innehållet av de enskilda alifatiska alkoholerna i mg/1 000 g fettämne och summan av de totala alifatiska alkoholerna antecknas.

TILLÄGG

Bestämning av den linjära hastigheten för gasen

1 till 3 µl metan (eller propan) sprutas in i gaskromatografen under vanliga driftförhållanden, och den tid det tar för metanet eller propanet att passera kolonnen från injektionsögonblicket till det ögonblick toppen eluerar (tM) mäts med stoppur.

Den linjära hastigheten i cm/s erhålls genom L/tM där L är kolonnens längd i cm och tM är tiden i sekunder som uppmäts med stoppur.



Figur 1 – Kromatogram över alkoholfractionen av jungfruolja

1 = Eicosanol	5 = Pentacosanol
2 = Docosanol	6 = Hexacosanol
3 = Tricosanol	7 = Heptacosanol
4 = Tetracosanol	8 = Octacosanol