

UITVOERINGSVERORDENING (EU) 2019/1604 VAN DE COMMISSIE**van 27 september 2019****tot wijziging van Verordening (EEG) nr. 2568/91 inzake de kenmerken van olijfoliën en oliën uit afvallen van olijven en de desbetreffende analysemethoden**

DE EUROPESE COMMISSIE,

Gezien het Verdrag betreffende de werking van de Europese Unie,

Gezien Verordening (EU) nr. 1308/2013 van het Europees Parlement en de Raad van 17 december 2013 tot vaststelling van een gemeenschappelijke ordening van de markten voor landbouwproducten en tot intrekking van de Verordeningen (EEG) nr. 922/72, (EEG) nr. 234/79, (EG) nr. 1037/2001 en (EG) nr. 1234/2007 van de Raad ⁽¹⁾, en met name artikel 91, eerste alinea, onder d),

Overwegende hetgeen volgt:

- (1) In Verordening (EEG) nr. 2568/91 van de Commissie ⁽²⁾ zijn de fysisch-chemische en organoleptische kenmerken van olijfolie en van olie uit perskoeken van olijven vastgesteld, alsmede de methoden om die kenmerken te beoordelen.
- (2) De methoden en de grenswaarden voor het bepalen van de kenmerken van de oliën worden regelmatig bijgewerkt op basis van het advies van chemisch deskundigen en het werk dat in de Internationale Olijfraad (IOR) is verricht.
- (3) Om de implementatie op Unieniveau van de meest recente, door de IOR vastgestelde internationale normen te waarborgen, moeten bepaalde analysemethoden zoals vastgesteld in Verordening (EEG) nr. 2568/91, worden bijgewerkt.
- (4) De handelsnorm van de IOR is gewijzigd wat betreft de uitdrukking van de grenswaarde van het gehalte aan vrije zuren, het peroxidegetal, de organoleptische beoordeling (mediaan voor de gebreken en mediaan van de fruitigheid) en het verschil tussen ECN42 (HPLC) en ECN42 (theoretische berekening), zulks omwille van de consistentie met de nauwkeurigheidswaarden van de analysemethode.
- (5) Overeenkomstig artikel 2 bis, lid 5, van Verordening (EEG) nr. 2568/91 moeten de lidstaten nagaan of een monster olijfolie overeenstemt met de opgegeven categorie door de in bijlage I bij die verordening vermelde kenmerken te controleren in om het even welke volgorde of in de volgorde die is opgenomen in het beslissingschema in bijlage I ter bij die verordening.
- (6) In het licht van recente ontwikkelingen is het passend de tabellen in bijlage I ter bij Verordening (EEG) nr. 2568/91 en het bijbehorende aanhangsel waar nodig bij te werken. Voorts blijkt de term "stroomschema" beter aan te sluiten op de inhoud van die bijlage I ter dan de term "beslissingschema".
- (7) In punt 9.4 van bijlage XII bij Verordening (EEG) nr. 2568/91 is de mediaan van de gebreken gedefinieerd als de mediaan van het gebrek dat met de grootste intensiteit is waargenomen. Aangezien de conformiteit van de olie door verschillende panels moet worden beoordeeld, moet worden verduidelijkt dat, in het kader van tegenanalyses, het besluit betreffende de conformiteit van de kenmerken van een olie met de opgegeven categorie uitsluitend verband houdt met de waarde van de mediaan van het voornaamste gebrek, ongeacht de aard ervan.
- (8) Verordening (EEG) nr. 2568/91 moet daarom dienovereenkomstig worden gewijzigd.
- (9) De in deze verordening vervatte maatregelen zijn in overeenstemming met het advies van het Comité voor de gemeenschappelijke ordening van de landbouwmarkten,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

Verordening (EEG) nr. 2568/91 wordt als volgt gewijzigd:

1) Artikel 2 wordt als volgt gewijzigd:

a) in lid 1 wordt punt l) vervangen door:

"l) voor de bepaling van de sterolsamenstelling en het sterolgehalte en voor de bepaling van de alcoholische verbindingen met behulp van gaschromatografie met capillaire kolommen, de in bijlage XIX beschreven methode";

⁽¹⁾ PB L 347 van 20.12.2013, blz. 671.

⁽²⁾ Verordening (EEG) nr. 2568/91 van de Commissie van 11 juli 1991 inzake de kenmerken van olijfoliën en oliën uit afvallen van olijven en de desbetreffende analysemethoden (PB L 248 van 5.9.1991, blz. 1).

b) in lid 2 wordt de derde alinea vervangen door:

“Wanneer het panel de indeling van de olie ten aanzien van de organoleptische kenmerken van de opgegeven categorie niet bevestigt, laten de nationale autoriteiten of hun vertegenwoordigers op verzoek van de belanghebbende onverwijld twee tegenanalyses door andere proeverpanels uitvoeren. Minstens één van de panels is erkend door de lidstaat van de betrokken producent. Er wordt aangenomen dat de betrokken kenmerken overeenstemmen met de opgegeven kenmerken als de twee tegenanalyses de indeling bevestigen. Als dat niet het geval is, wordt de indeling, ongeacht de aard van de tijdens de tegenanalyses waargenomen defecten, als zijnde niet in overeenstemming met de kenmerken verklaard, en komen de kosten van de tegenanalyses voor rekening van de belanghebbende.”.

2) In artikel 2 bis, lid 5, wordt punt b) vervangen door:

“b) de in het stroomschema in bijlage I ter weergegeven volgorde te volgen totdat dit proces uitmondt in een van de in dat schema vermelde beslissingen.”.

3) De tabel “BIJLAGEN Inhoudsopgave” wordt vervangen door de tabel in bijlage I bij deze verordening.

4) Bijlage I wordt vervangen door de tekst in bijlage II bij deze verordening.

5) In bijlage I bis wordt punt 2.1 vervangen door:

“2.1. Elk primair monster moet worden onderverdeeld in laboratoriummonsters, in overeenstemming met punt 2.5 van norm EN ISO 5555, en worden geanalyseerd in de volgorde die is weergegeven in het stroomschema dat is opgenomen in bijlage I ter, of in een andere willekeurige volgorde.”.

6) Bijlage I ter wordt vervangen door de tekst in bijlage III bij deze verordening.

7) Bijlage V wordt geschrapt.

8) In bijlage VII wordt punt 4.2 vervangen door:

“4.2. n-hexaan (voor chromatografie). Hexaan mag worden vervangen door iso-octaan (2,2,4-trimethylpentaan voor chromatografie), mits daarmee vergelijkbare nauwkeurigheidswaarden worden bereikt.”.

9) Bijlage XII wordt gewijzigd overeenkomstig bijlage IV bij deze verordening.

10) Bijlage XVII wordt gewijzigd overeenkomstig bijlage V bij deze verordening.

11) Bijlage XVIII wordt gewijzigd overeenkomstig bijlage VI bij deze verordening.

12) Bijlage XIX wordt vervangen door de tekst in bijlage VII bij deze verordening.

13) In bijlage XX wordt punt 4.2 vervangen door:

“4.2. n-hexaan, voor chromatografie of residuanalyse. Hexaan mag worden vervangen door iso-octaan (2,2,4-trimethylpentaan voor chromatografie), mits daarmee vergelijkbare nauwkeurigheidswaarden worden bereikt. Oplosmiddelen met een hoger kookpunt dan n-hexaan verdampen langzamer. Zij hebben echter de voorkeur vanwege de toxiciteit van hexaan. De zuiverheid moet worden gecontroleerd; er kan bijvoorbeeld een indamprest van 100 ml oplosmiddel worden gecontroleerd.

WAARSCHUWING — De dampen kunnen ontvlammen. Uit de buurt van hittebronnen, vonken of open vlammen houden. Zorg ervoor dat de flessen altijd goed zijn gesloten. Zorg voor adequate ventilatie tijdens het gebruik. Voorkom de accumulatie van dampen en verwijder eventuele bronnen van brand, zoals verwarmingstoestellen of elektrische apparaten die niet met onontvlambaar materiaal zijn vervaardigd. Schadelijk bij inademing vanwege mogelijke schade aan zenuwcellen. Adem de dampen niet in. Gebruik zo nodig een geschikt ademapparaat. Vermijd contact met ogen en huid.

Iso-octaan is een ontvlambare vloeistof met brandgevaar. De explosiegrenswaarden in de lucht zijn 1,1 % en 6 % (volumefractie). Giftig bij inslikken en bij inademing. Gebruik bij hantering van dit oplosmiddel een goed werkende dampafzuigkap.”.

Artikel 2

Deze verordening treedt in werking op de twintigste dag na die van de bekendmaking ervan in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke lidstaat.

Gedaan te Brussel, 27 september 2019.

Voor de Commissie
De voorzitter
Jean-Claude JUNCKER

BIJLAGE I

"BIJLAGEN"

INHOUDSOPGAVE

Bijlage I	Kenmerken van olijfolie
Bijlage I bis	Bemonstering van olijfolie of olie uit perskoeken van olijven die worden geleverd in onmiddellijke verpakkingen
Bijlage I ter	Stroomschema om na te gaan of een monster olijfolie overeenstemt met de opgegeven categorie
Bijlage II	Bepaling van vrije vetzuren, koude methode
Bijlage III	Bepaling van het peroxidegetal
Bijlage IV	Bepaling van het wasgehalte met behulp van gaschromatografie met capillaire kolommen
Bijlage VII	Bepaling van het percentage glycerol-2-monopalmitaat
Bijlage IX	Spectrofotometrisch onderzoek in het ultraviolette gebied
Bijlage X	Gaschromatografische bepaling van methylesters van vetzuren
Bijlage XI	Bepaling van het gehalte aan gehalogeneerde oplosmiddelen
Bijlage XII	Methode van de Internationale Olijfolieraad voor de organoleptische beoordeling van olijfolie van de eerste persing
Bijlage XV	Bepaling van het oliegehalte van de afvallen van olijven
Bijlage XVI	Bepaling van het joodgetal
Bijlage XVII	Methode voor de bepaling van stigmastadiënen in plantaardige oliën
Bijlage XVIII	Bepaling van het verschil tussen het werkelijke en het theoretische gehalte aan triacylglycerolen met ECN 42
Bijlage XIX	Bepaling van de sterolsamenstelling en het sterolgehalte en van de alcoholische verbindingen met behulp van capillaire gaschromatografie
Bijlage XX	Methode voor de bepaling van het gehalte aan wassen, methylesters van vetzuren en ethylesters van vetzuren met behulp van capillaire gaschromatografie
Bijlage XXI	Resultaten van de conformiteitscontroles van olijfoliën als bedoeld in artikel 8, lid 2"

KENMERKEN VAN OLIJFOLIE

Kwaliteitskenmerken

Categorie	Zuurgraad (%) (*)	Peroxidegetal (mEq O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₆₈ of K ₂₇₀	Delta-K	Organoleptische beoordeling		Ethylesters van vetzuren (mg/kg)
						Mediaan voor de gebreken (Md) (*)	Mediaan "fruitig" (Mf)	
1. Extra olijfolie van de eerste persing	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Olijfolie van de eerste persing	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Olijfolie voor verlichting	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (1)	—	—
4. Geraffineerde olijfolie	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16	—	—	—
5. Olijfolie bestaande uit geraffineerde olijfolie en olijfolie van de eerste persing	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15	—	—	—
6. Ruwe olie uit perskoeken van olijven	—	—	—	—	—	—	—	—
7. Geraffineerde olie uit perskoeken van olijven	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—	—
8. Olie uit perskoeken van olijven	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—	—

(1) Of de mediaan voor de gebreken is lager dan of gelijk aan 3,5 terwijl de mediaan "fruitig" gelijk is aan 0,0.

Zuiverheidskenmerken

Categorie	Vetzurenamenstelling ⁽¹⁾						Totaal transoliezuur isomeren (%)	Totaal translinolzuur en translinoleenzuurisomeren (%)	Stigmastadiënen (mg/kg) ⁽²⁾	Verschil: ECN42 (HPLC) en ECN42 (theoretische berekening)	Glycerol-2-monopalmitaat (%)
	Myristinezuur (%)	Linoleenzuur (%)	Arachidezuur (%)	Eicosaanzuur (%)	Beeenzuur (%)	Lignocerinezuur (%)					
1. Extra olijfolie van de eerste persing	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 als % palmitinezuur totaal ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 als % palmitinezuur totaal > 14,00 %
2. Olijfolie van de eerste persing	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 als % palmitinezuur totaal ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 als % palmitinezuur totaal > 14,00 %
3. Olijfolie voor verlichting	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,9 als % palmitinezuur totaal ≤ 14,00 %
											≤ 1,1 als % palmitinezuur totaal > 14,00 %
4. Geraffineerde olijfolie	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9 als % palmitinezuur totaal ≤ 14,00 %
											≤ 1,1 als % palmitinezuur totaal > 14,00 %
5. Olijfolie bestaande uit geraffineerde olijfolie en olijfolie van de eerste persing	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9 als % palmitinezuur totaal ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 als % palmitinezuur totaal > 14,00 %
6. Ruwe olie uit perskoeken van olijven	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,60	≤ 1,4
7. Geraffineerde olie uit perskoeken van olijven	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,4
8. Olie uit perskoeken van olijven	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,2

⁽¹⁾ Gehalte aan andere vetzuren (%): palmitinezuur: 7,50-20,00; palmitoleïnezuur: 0,30-3,50; heptadecaanzuur: ≤ 0,40; heptadeceenzuur ≤ 0,60; stearinezuur: 0,50-5,00; oliezuur: 55,00-83,00; linolzuur: 2,50-21,00.

⁽²⁾ Totaal van de isomeren dat (al dan niet) kan worden gescheiden over een capillaire kolom.

Categorie	Sterolsamenstelling						Totaal sterolen (mg/kg)	Erytrodiol en uvaol (%) (**)	Was (mg/kg) (**)
	Cholesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol ⁽¹⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App β -sitosterol ⁽²⁾ (%)	Delta-7-stigmasterol ⁽¹⁾ (%)			
1. Extra olijfolie van de eerste persing	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Olijfolie van de eerste persing	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Olijfolie voor verlichting	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	-	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$ ⁽³⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ ⁽³⁾
4. Geraffineerde olijfolie	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Olijfolie bestaande uit geraffineerde olijfolie en olijfolie van de eerste persing	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Ruwe olie uit perskoeken van olijven	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	-	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 2\ 500$	$> 4,5$ ⁽⁴⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ ⁽⁴⁾
7. Geraffineerde olie uit perskoeken van olijven	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 800$	$> 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Olie uit perskoeken van olijven	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< Camp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 600$	$> 4,5$	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

⁽¹⁾ Zie het aanhangsel bij deze bijlage.

⁽²⁾ App β -sitosterol: delta-5,23-stigmastadiënol + clerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadiënol.

⁽³⁾ Olie met een wasgehalte van 300 mg/kg tot 350 mg/kg wordt als olijfolie voor verlichting aangemerkt wanneer het totaalgehalte aan alifatische alcoholen niet hoger is dan 350 mg/kg of wanneer het gehalte aan erytrodiol en uvaol niet meer bedraagt dan 3,5 %.

⁽⁴⁾ Olie met een wasgehalte van 300 mg/kg tot 350 mg/kg wordt als ruwe olie uit perskoeken van olijven aangemerkt wanneer het totaalgehalte aan alifatische alcoholen hoger is dan 350 mg/kg en wanneer het gehalte aan erytrodiol en uvaol meer bedraagt dan 3,5 %.

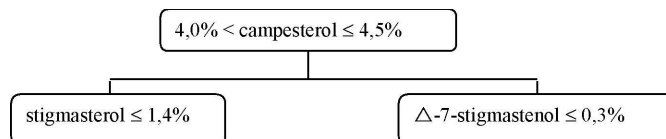
Opmerkingen:

- De resultaten van de analyses moeten worden opgegeven met hetzelfde aantal decimale cijfers als in de normen voor elk kenmerk. De laatste significante decimaal wordt naar boven afgerond als de volgende decimaal hoger is dan 4.
- Om olie in een andere categorie in te delen of niet-conform in de zin van deze verordening te verklaren, volstaat het dat een van de kenmerken niet aan de vastgestelde normen beantwoordt.
- Voor olijfolie voor verlichting mogen beide met een asterisk (*) aangegeven kwaliteitskenmerken tegelijkertijd afwijken van de voor die categorie vastgestelde grenswaarden.
- Bij de kenmerken met dubbele asterisk (**) geldt voor ruwe olie uit perskoeken van olijven dat beide relevante grenswaarden tegelijkertijd mogen afwijken van de vermelde waarden. Voor olie uit perskoeken van olijven en geraffineerde olie uit perskoeken van olijven mag een van de relevante grenswaarden afwijken van de vermelde waarden.

Aanhangsel

Beslissingsschema's

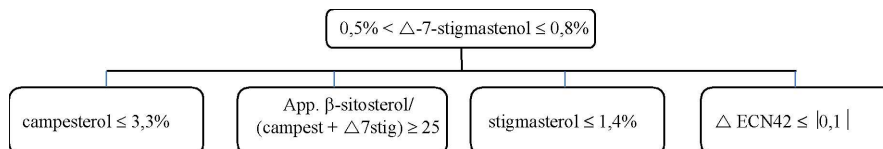
Beslissingsschema betreffende **campesterol** voor olijfolie van de eerste persing en extra olijfolie van de eerste persing:



De andere parameters moeten aan de in deze verordening vastgestelde grenswaarden voldoen.

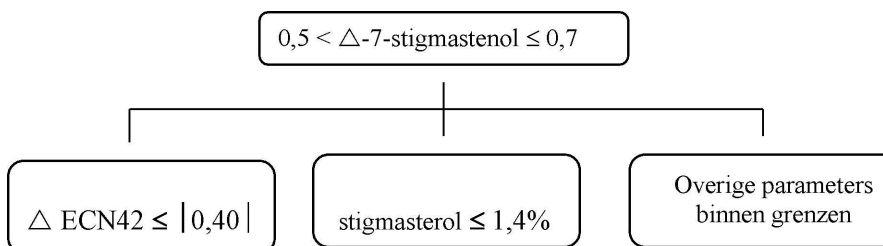
Beslissingsschema betreffende **delta-7-stigmastenol** voor:

— Olijfolie van de eerste persing en extra olijfolie van de eerste persing



De andere parameters moeten aan de in deze verordening vastgestelde grenswaarden voldoen.

— Olie uit perskoeken van olijven (ruw en geraffineerd)



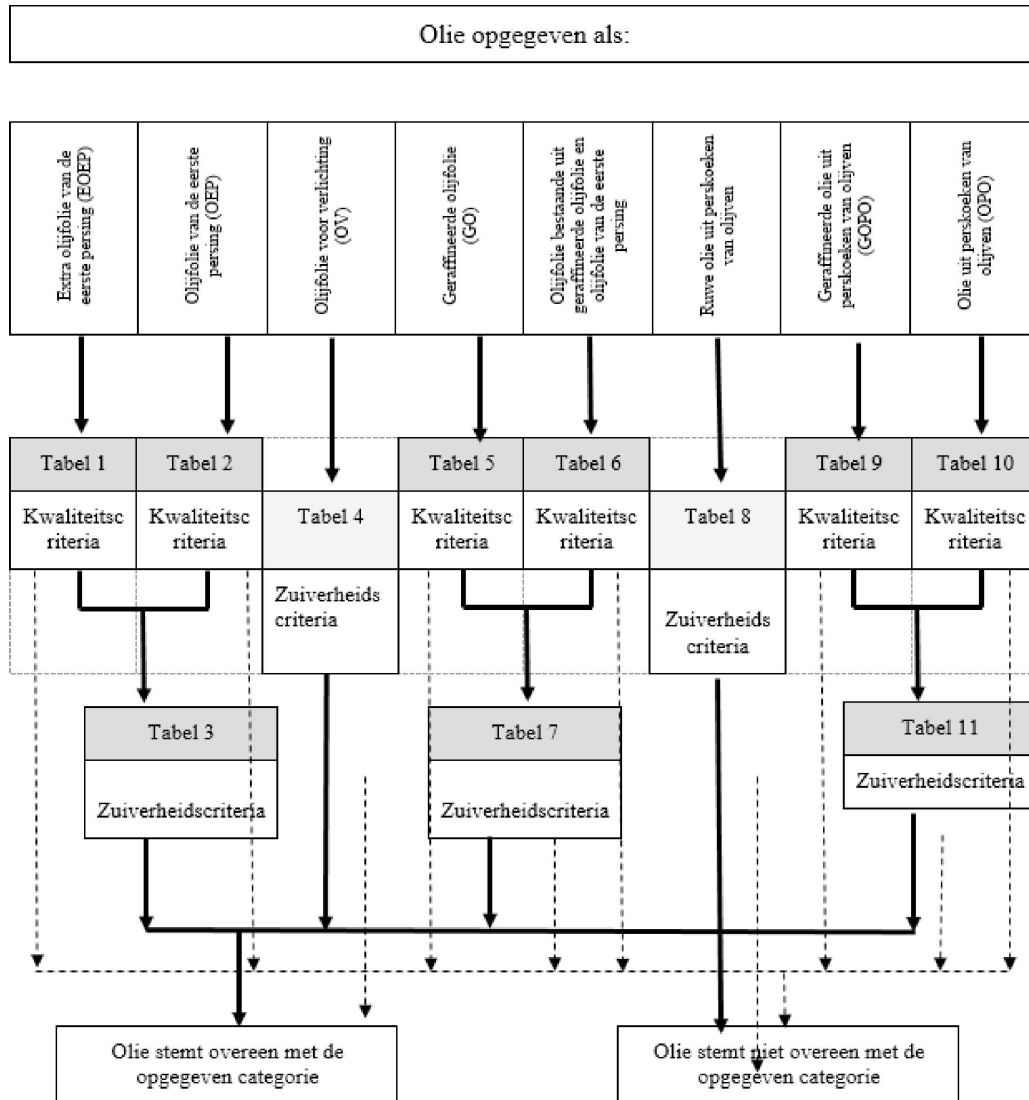
De andere parameters moeten aan de in deze verordening vastgestelde grenswaarden voldoen.”

BIJLAGE III

"BIJLAGE I ter

STROOMSCHEMA OM NA TE GAAN OF EEN MONSTER OLIJFOLIE OVEREENSTEMT MET DE OPgegeven CATEGORIE

Algemene tabel



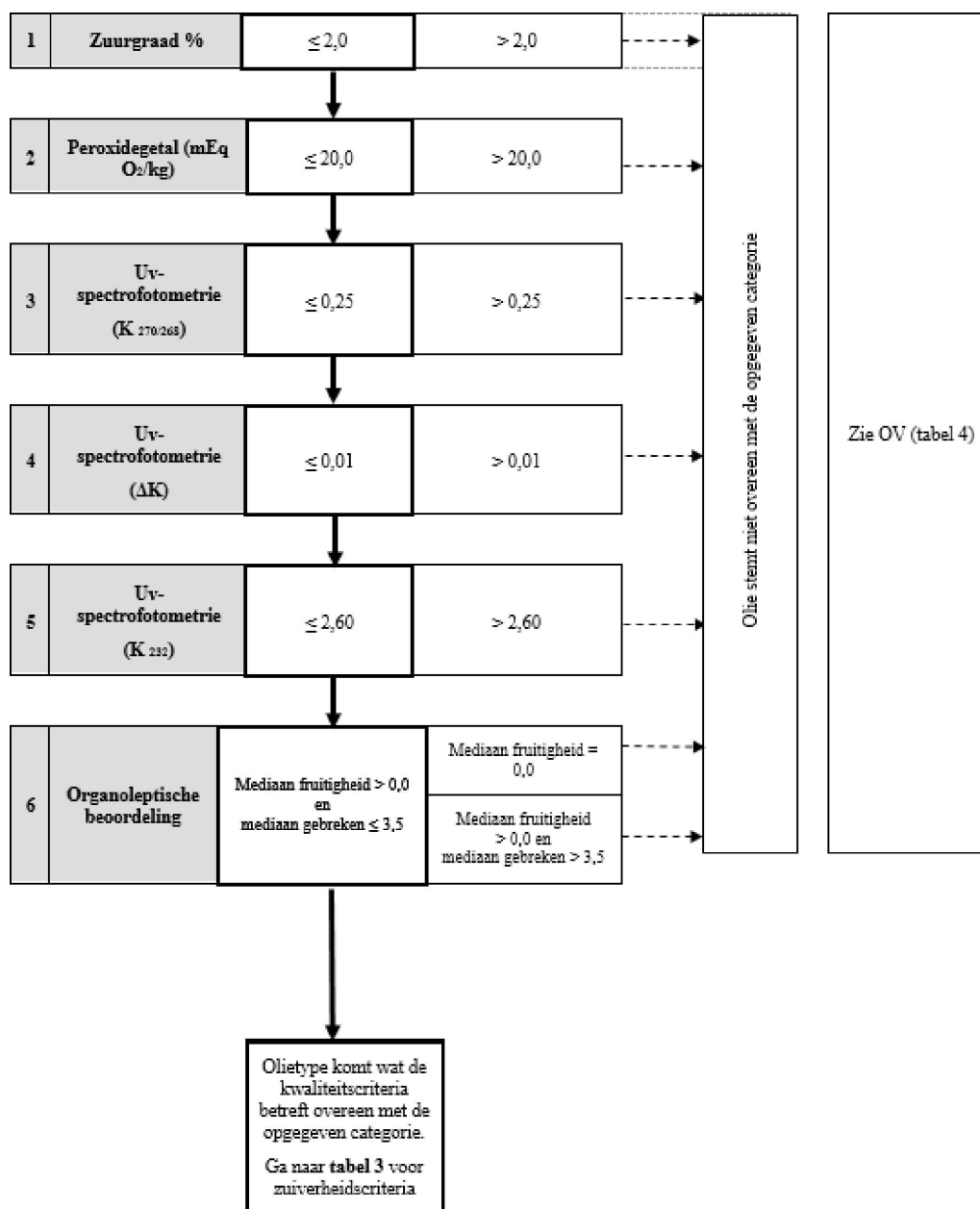
Tabel 1 — extra olijfolie van de eerste persing — kwaliteitscriteria

1	Zuurgraad %	$\leq 0,80$	$> 0,80$	Olie stemt niet overeen met de opgegeven categorie	Zie OEP (tabel 2)
2	Peroxidegetal (mEq O ₂ /kg)	$\leq 20,0$	$> 20,0$		Zie OV (tabel 4)
3	Uv-spectrofotometrie (K _{270/268})	$\leq 0,22$	$> 0,22$		Zie OEP (tabel 2)
4	Uv-spectrofotometrie (ΔK)	$\leq 0,01$	$> 0,01$		Zie OV (tabel 4)
5	Uv-spectrofotometrie (K ₁₃₂)	$\leq 2,50$	$> 2,50$		Zie OEP (tabel 2)
6	Organoleptische beoordeling	Mediaan fruitigheid $> 0,0$ en mediaan gebreken = $0,0$	Mediaan fruitigheid = $0,0$		Zie OV (tabel 4)
			Mediaan fruitigheid $> 0,0$ en Mediaan gebreken $> 0,0$		Zie OEP (tabel 2)
7	Ethylesters van vetzuren (mg/kg)	≤ 35	> 35	Zie OEP (tabel 2)	

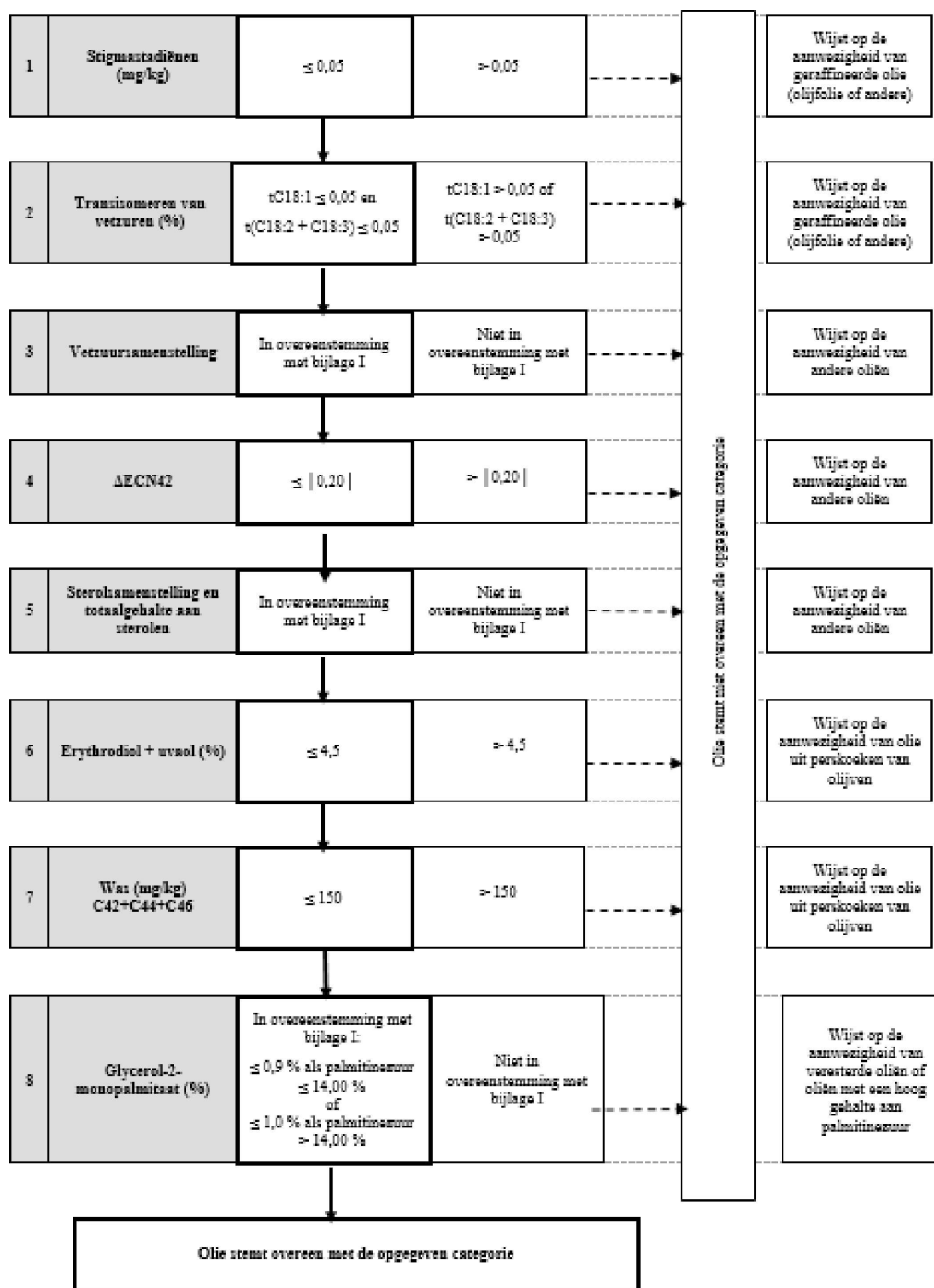
↓

Olietype komt wat de kwaliteitscriteria betreft overeen met de opgegeven categorie.
Ga naar tabel 3 voor zuiverheidscriteria

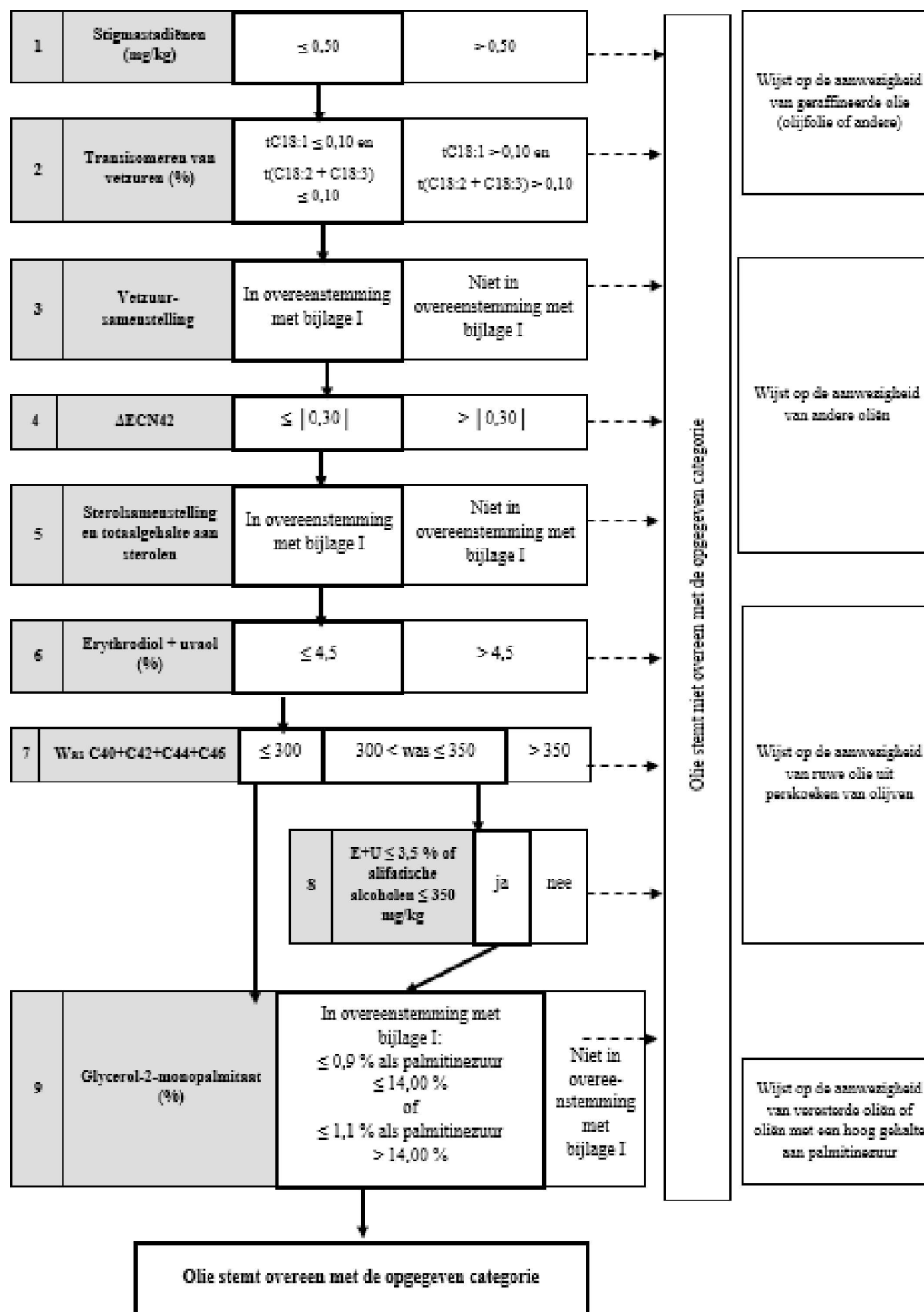
Tabel 2 — olijfolie van de eerste persing — kwaliteitscriteria



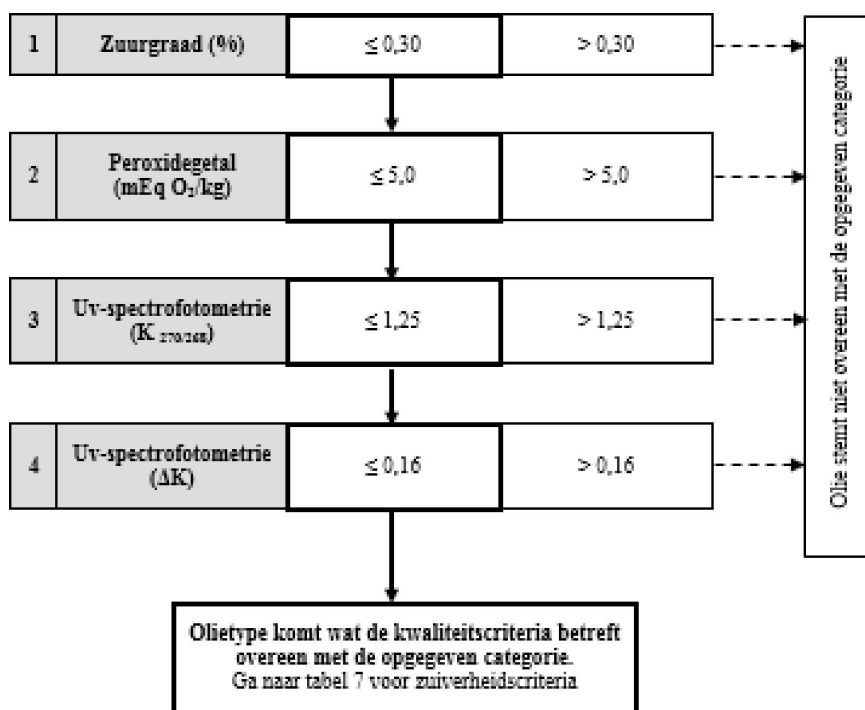
Tabel 3 — extra olijfolie van de eerste persing en olijfolie van de eerste persing — zuiverheidscriteria



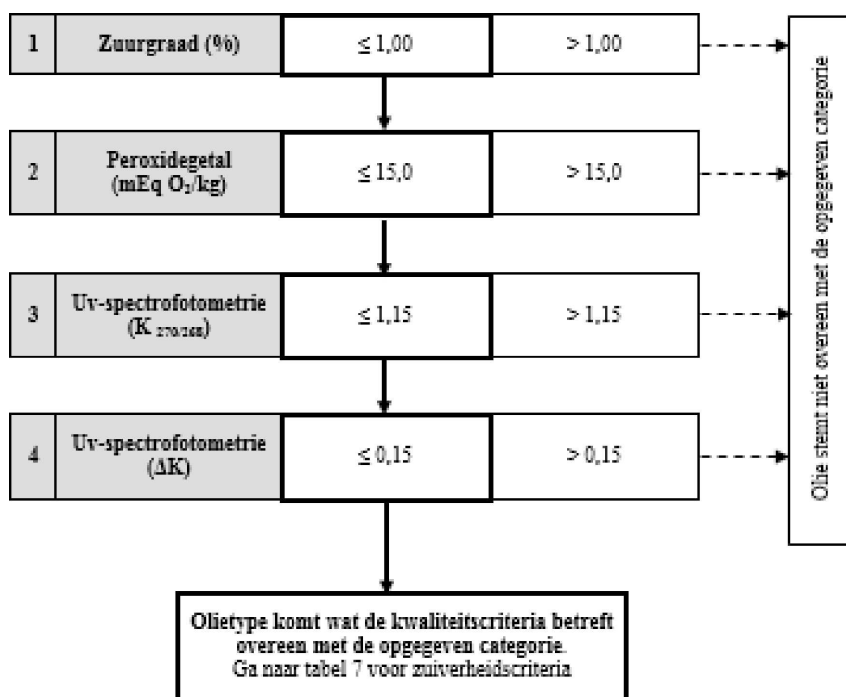
Tabel 4 — olijfolie voor verlichting — zuiverheidscriteria



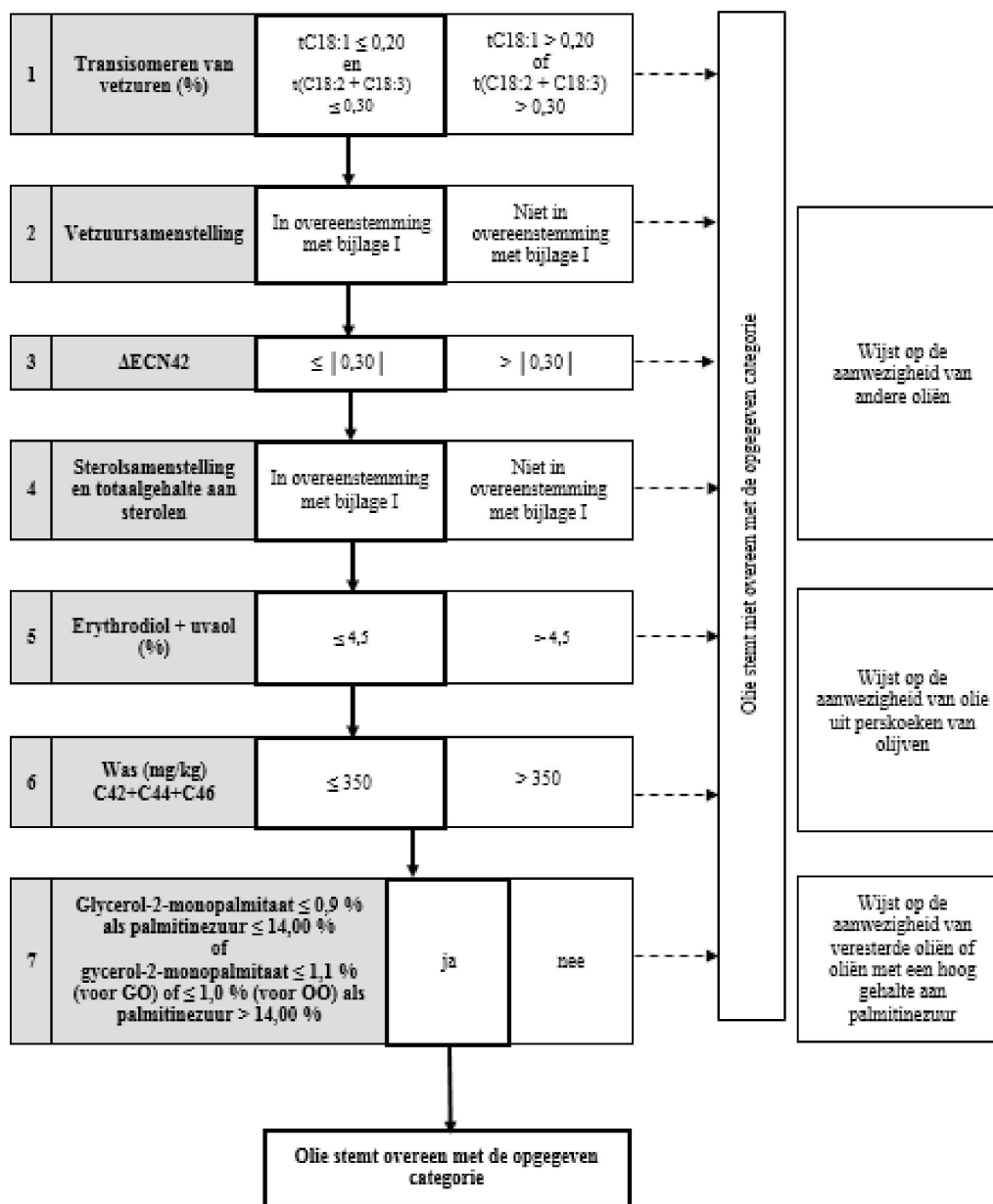
Tabel 5 — geraffineerde olijfolie — kwaliteitscriteria

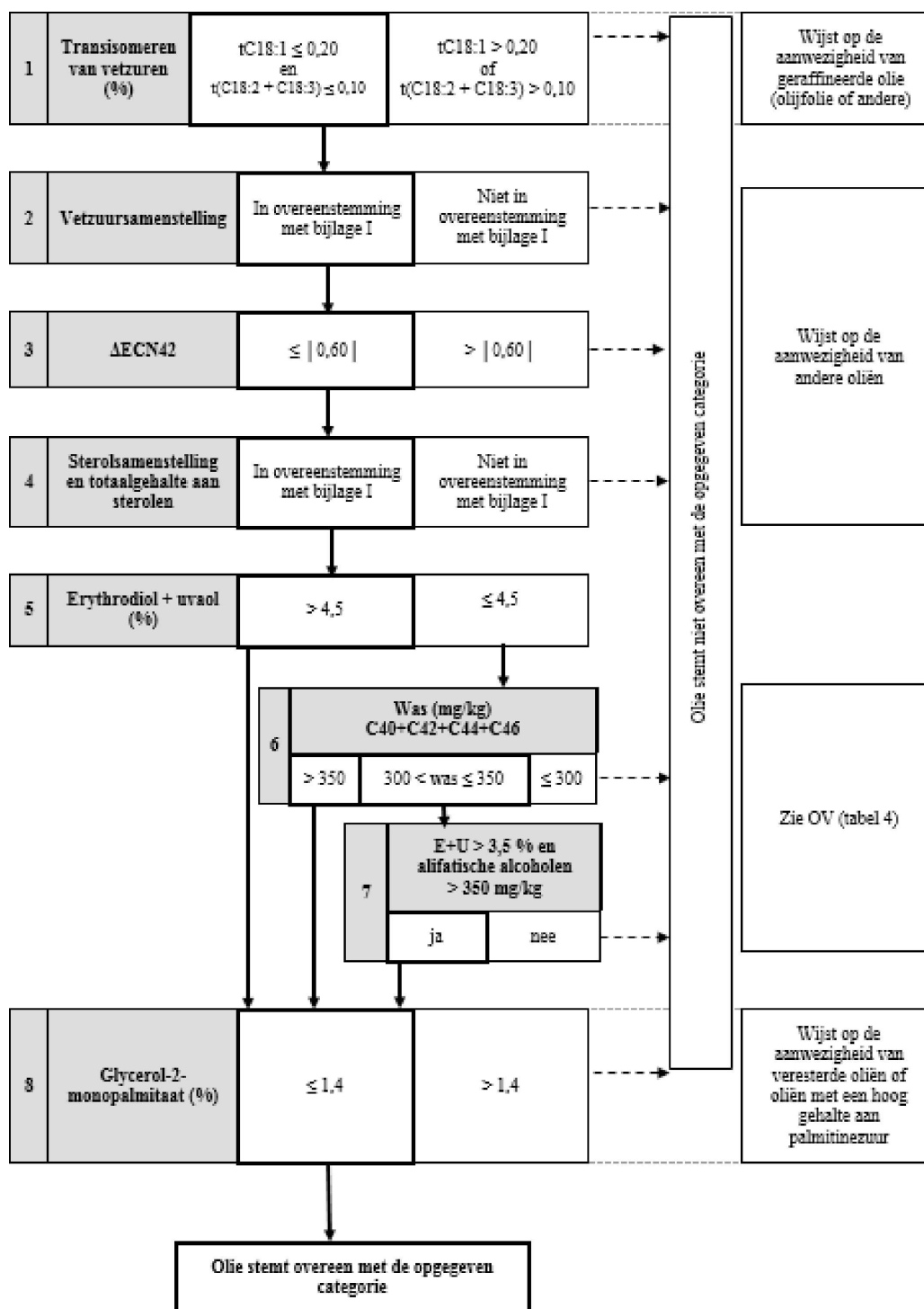


Tabel 6 — olijfolie (bestaande uit een mengsel van geraffineerde olijfolie en olijfolie van de eerste persing) — kwaliteitscriteria

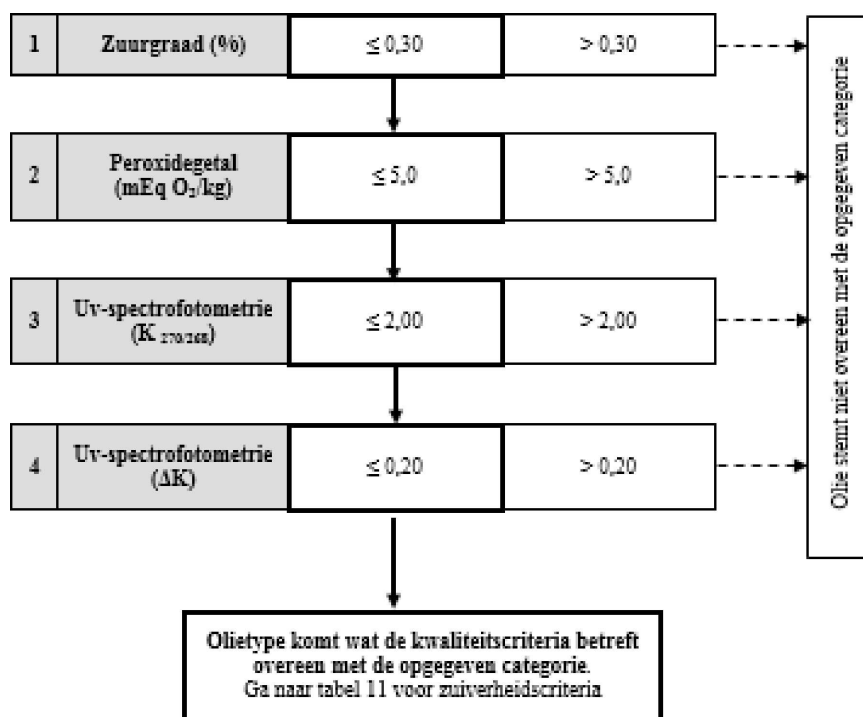


Tabel 7 — geraffineerde olijfolie en olijfolie die bestaat uit een mengsel van geraffineerde olijfolie en olijfolie van de eerste persing — zuiverheidscriteria

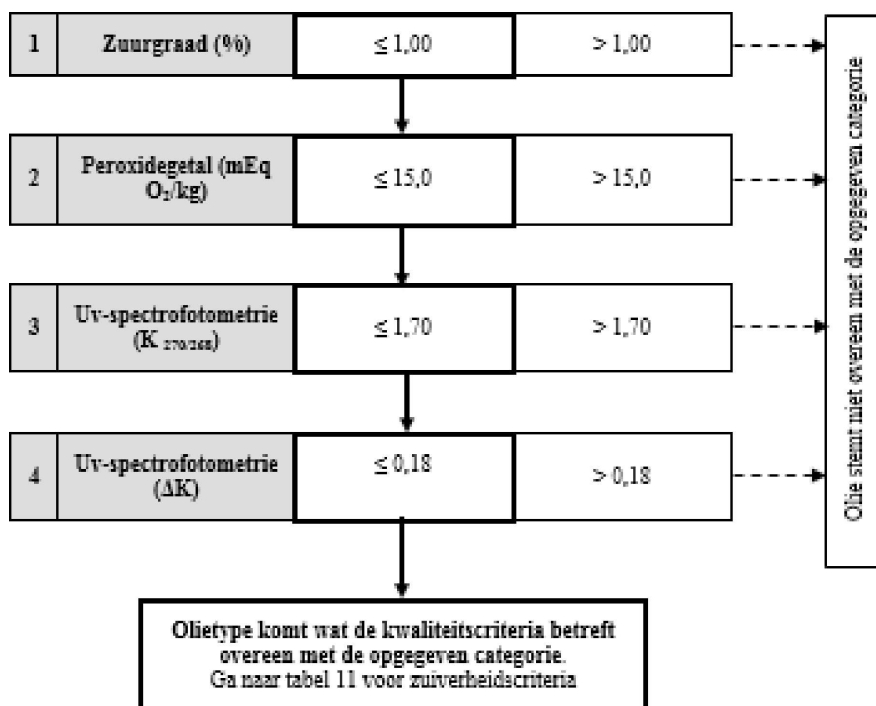


Tabel 8 — ruwe olie uit perskoeken van olijven — zuiverheidscriteria


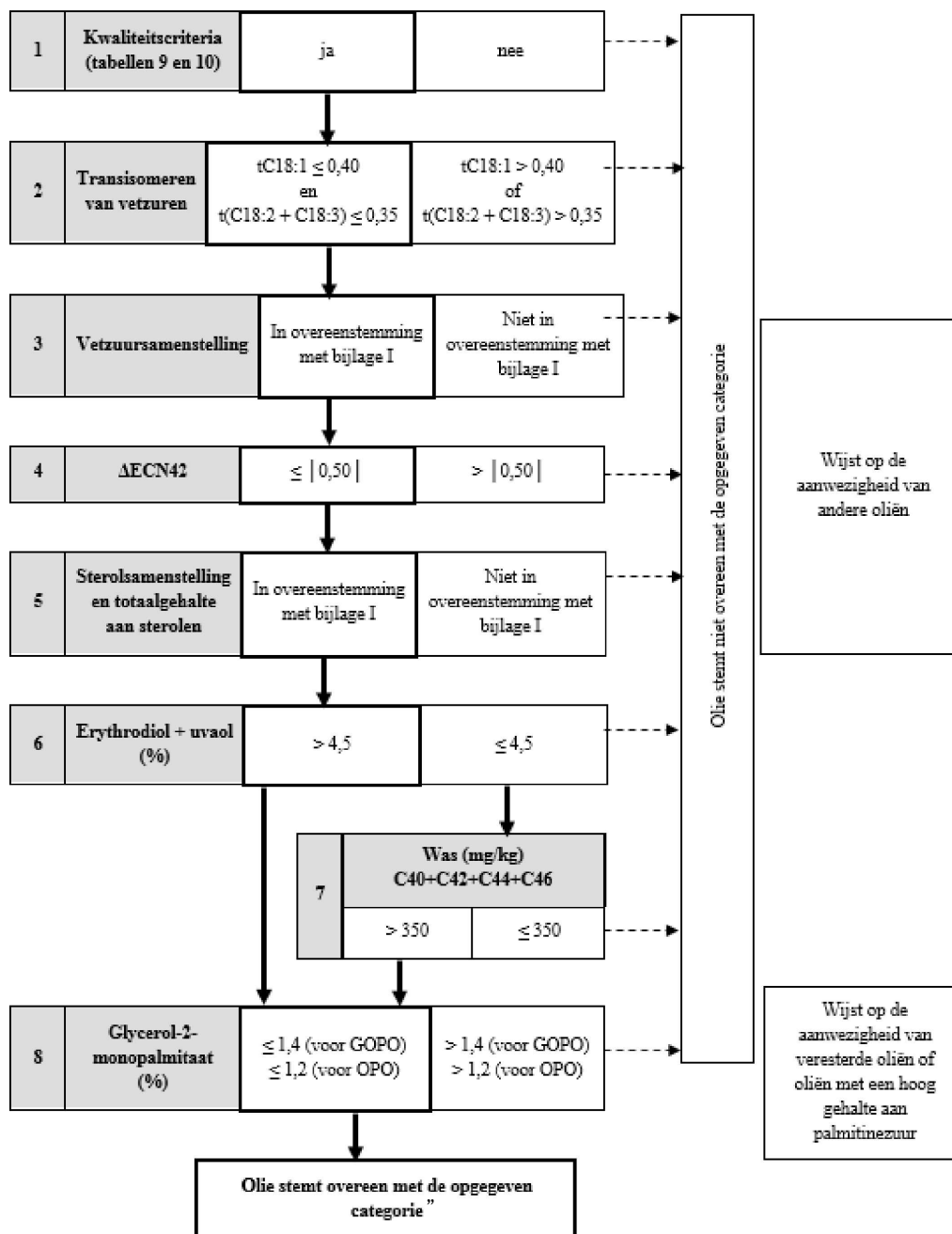
Tabel 9 — geraffineerde olie uit perskoeken van olijven — kwaliteitscriteria



Tabel 10 — olie uit perskoeken van olijven — kwaliteitscriteria



Tabel 11 — geraffineerde olie uit perskoecken van olijven en olie uit perskoecken van olijven — zuiverheids-criteria



BIJLAGE IV

Bijlage XII wordt als volgt gewijzigd:

1) Punt 3.3 wordt vervangen door:

“3.3. Facultatieve terminologie voor de etikettering

Op verzoek kan de voorzitter van het panel uitsluitend voor de volgende termen certificeren dat de beoordeelde olie, afhankelijk van de intensiteit en de waarneming van de kenmerken, aan de definities voldoet en binnen het desbetreffende bereik valt:

Positieve kenmerken (fruitig, bitter en scherp): afhankelijk van de intensiteit van de gewaarwording:

- *krachtig*: wanneer de mediaan van het betrokken kenmerk hoger dan 6,0 ligt;
- *gemiddeld*: wanneer de mediaan van het betrokken kenmerk hoger dan 3,0 en niet hoger dan 6,0 ligt;
- *delicaat*: wanneer de mediaan van het betrokken kenmerk niet hoger dan 3,0 ligt.

<i>Fruitigheid</i>	Reeks reukgewaarwordingen die kenmerkend zijn voor de olie, afhankelijk van de olijvensoort, afkomstig van gezonde en verse olijven, waarin groene noch rijpe fruitigheid de boventoon voert. De gewaarwording vindt rechtstreeks en/of retronasaal plaats.
<i>Groene fruitigheid</i>	Reeks reukgewaarwordingen die kenmerkend is voor de olie en die doet denken aan groene vruchten, afhankelijk van de olijvensoort en afkomstig van groene, gezonde en verse olijven. De gewaarwording vindt rechtstreeks en/of retronasaal plaats.
<i>Rijpe fruitigheid</i>	Reeks reukgewaarwordingen die kenmerkend is voor de olie en die doet denken aan rijpe vruchten, afhankelijk van de olijvensoort en afkomstig van gezonde en verse olijven. De gewaarwording vindt rechtstreeks en/of retronasaal plaats.
<i>Evenwichtig</i>	Een olie die niet onevenwichtig is, hetgeen betekent dat de reuk/smaakgewaarwordingen en het mondgevoel van de olie zodanig zijn dat de mediaan van het kenmerk bitter en de mediaan van het kenmerk scherp niet meer dan 2,0 punten hoger liggen dan de mediaan van het kenmerk fruitigheid.
<i>Zachte olie</i>	Een olie waarvan de mediaan van het kenmerk bitter en de mediaan van het kenmerk scherp niet hoger dan 2,0 liggen.

Lijst van termen volgens de intensiteit van de gewaarwording:

Termen waarvoor een organoleptisch analysecertificaat nodig is	Mediaan van het betrokken kenmerk
Fruitigheid	—
Rijpe fruitigheid	—
Groene fruitigheid	—
Delicate fruitigheid	$\leq 3,0$
Gemiddelde fruitigheid	$3,0 < Me \leq 6,0$
Krachtige fruitigheid	$> 6,0$
Delicate rijpe fruitigheid	$\leq 3,0$
Gemiddelde rijpe fruitigheid	$3,0 < Me \leq 6,0$
Krachtige rijpe fruitigheid	$> 6,0$
Delicate groene fruitigheid	$\leq 3,0$
Gemiddelde groene fruitigheid	$3,0 < Me \leq 6,0$
Krachtige groene fruitigheid	$> 6,0$

Termen waarvoor een organoleptisch analysecertificaat nodig is	Mediaan van het betrokken kenmerk
Delicate bitterheid	$\leq 3,0$
Gemiddelde bitterheid	$3,0 < Me \leq 6,0$
Krachtige bitterheid	$> 6,0$
Delicate scherpte	$\leq 3,0$
Gemiddelde scherpte	$3,0 < Me \leq 6,0$
Krachtige scherpte	$> 6,0$
Evenwichtige olie	De mediaan van het kenmerk bitter en de mediaan van het kenmerk scherp liggen niet meer dan 2,0 punten hoger dan de mediaan van het kenmerk fruitigheid.
Zachte olie	De mediaan van het kenmerk bitter en de mediaan van het kenmerk scherp liggen niet hoger dan 2,0.”.

2) Punt 9.4 wordt vervangen door:

“9.4. Indeling van de olie

De olie wordt aan de hand van de mediaan van de gebreken en de mediaan van het kenmerk fruitigheid in een van onderstaande categorieën ingedeeld. De mediaan van de gebreken wordt gedefinieerd als de mediaan van het gebrek dat met de grootste intensiteit is waargenomen. De mediaan van de gebreken en de mediaan van de fruitigheid worden met één decimaal weergegeven.

De indeling van de olie gebeurt door de waarde van de mediaan van de gebreken en de mediaan van de fruitigheid met onderstaande referentie-intervallen te vergelijken. Aangezien bij de vaststelling van de grenzen van deze intervallen rekening is gehouden met de fout van de methode, worden zij als absoluut beschouwd. Met de computerprogramma's kan de indeling als een tabel met statistische gegevens of als een grafiek zichtbaar worden gemaakt.

- Extra olijfolie van de eerste persing: de mediaan van de gebreken is gelijk aan 0,0 en de mediaan van de fruitigheid is hoger dan 0,0;
- olijfolie van de eerste persing: de mediaan van de gebreken is hoger dan 0,0, maar niet hoger dan 3,5 en de mediaan van de fruitigheid is hoger dan 0,0;
- olijfolie van de eerste persing, voor verlichting: de mediaan voor de gebreken is hoger dan 3,5 of de mediaan voor de gebreken is lager dan of gelijk aan 3,5 en de mediaan van de fruitigheid is gelijk aan 0,0.

Opmerking 1: Wanneer de mediaan van het kenmerk “bitter” en/of “scherp” hoger dan 5,0 ligt, vermeldt de voorzitter van het panel dit op het analysecertificaat.

Wanneer een analyse wordt uitgevoerd om na te gaan of aan de normen wordt voldaan, wordt één bepaling gedaan. Bij tegenanalyses moet de analyse in duplo in verschillende proefsessies worden uitgevoerd. De resultaten van de duplicaatanalyse moeten statistisch homogeen zijn (zie punt 9.5). Als dat niet het geval is, moet het monster opnieuw twee keer worden geanalyseerd. De definitieve waarde van de mediaan van de indelingskenmerken wordt berekend als het gemiddelde van de beide medianen.”.

BIJLAGE V

Bijlage XVII wordt als volgt gewijzigd:

1) Punt 5.1 wordt vervangen door:

“5.1. Hexaan of een mengsel van alkanen met een kooktraject van 65-70 °C, gedestilleerd met een fractioneerkolom. Hexaan mag worden vervangen door iso-octaan (2,2,4-trimethylpentaan voor chromatografie), mits daarmee vergelijkbare nauwkeurigheidswaarden worden bereikt. De indamprest van 100 ml oplosmiddel kan worden gecontroleerd. Oplosmiddelen met een hoger kookpunt dan n-hexaan verdampen langzamer. Zij hebben echter de voorkeur vanwege de toxiciteit van hexaan.”.

2) Aan punt 6.3.3 wordt de volgende tekst toegevoegd:

“NB 10 Wanneer stigmastadiënen in concentraties van meer dan 4 mg/kg voorkomen, moet voor een eventuele kwantificering de methode van de Internationale Olijfraad voor de bepaling van sterenen in geraffineerde olie worden toegepast.”.

—

BIJLAGE VI

Bijlage XVIII wordt als volgt gewijzigd:

1) Punt 4.2.1 wordt vervangen door:

“4.2.1. Petroleumether 40-60 °C voor chromatografie of hexaan. Hexaan mag worden vervangen door iso-octaan (2,2,4-trimethylpentaan voor chromatografie), mits daarmee vergelijkbare nauwkeurigheidswaarden worden bereikt. Oplosmiddelen met een hoger kookpunt dan n-hexaan verdampen langzamer. Zij hebben echter de voorkeur vanwege de toxiciteit van hexaan.”.

2) Het volgende punt 4.2.12 wordt toegevoegd:

“4.2.12. Heptaan voor chromatografie. Heptaan mag worden vervangen door iso-octaan (2,2,4-trimethylpentaan voor chromatografie).”.

—

BIJLAGE VII

"BIJLAGE XIX

BEPALING VAN DE STEROLSAMENSTELLING EN HET STEROLGEHALTE EN VAN DE ALCOHOLISCHE VERBINDINGEN MET BEHULP VAN CAPILLAIRE GASCHROMATOGRAPHIE

1. TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode beschrijft een werkwijze voor de bepaling van het individuele en het totale gehalte aan alcoholische verbindingen van olijfolie en olie uit perskoeken van olijven en van mengsels van deze twee soorten olie.

Tot de alcoholische verbindingen van olijfolie en olie uit perskoeken van olijven behoren alifatische alcoholen, sterolen en triterpeendialcoholen.

2. PRINCIPE

De oliën, waaraan α -cholestanol en 1-icosanol als interne standaarden zijn toegevoegd, worden verzeept met ethanolische kaliumhydroxideoplossing, waarna de onverzeepbare bestanddelen worden geëxtraheerd met ethylether.

De verschillende fracties van de alcoholische verbindingen worden van de onverzeepbare bestanddelen gescheiden met behulp van dunnelaagchromatografie op basische platen met silicagel (referentiemethode) of HPLC met een silicagelkolom. De fractie die na de scheiding op silicagel is opgevangen, wordt omgezet in trimethylsilylethers en via gaschromatografie met capillaire kolommen geanalyseerd.

DEEL 1**BEREIDING VAN DE ONVERZEEPBARE BESTANDDELEN**

1. TOEPASSINGSGEBIED

Dit deel omvat een beschrijving van de bereiding en de extractie van de onverzeepbare bestanddelen. Het heeft betrekking op de bereiding en de extractie van de onverzeepbare bestanddelen van olijfolie en olie uit perskoeken van olijven.

2. PRINCIPE

Een proefeenheid wordt verzeept door onder terugvloeiokoeling te koken met een ethanolische kaliumhydroxideoplossing. De onverzeepbare bestanddelen worden geëxtraheerd met di-ethylether.

3. APPARATUUR

De gebruikelijke laboratoriumuitrusting en in het bijzonder het volgende:

- 3.1. Rondbodempkolf van 250 ml, voorzien van een refluxkoeler met slijpstukken.
- 3.2. Scheitrechter van 500 ml.
- 3.3. Kolven van 250 ml.
- 3.4. Micro-injectiespuiten van 100 μ L en 500 μ L.
- 3.5. Filterkroes G3 (porositeit 15-40 μ m) met een diameter van ongeveer 2 cm en een hoogte van ongeveer 5 cm, geschikt om onder vacuüm te filtreren en voorzien van een slijpstuk 12/21 (uitwendig).
- 3.6. Erlenmeyer van 50 ml, voorzien van een slijpstuk 12/21 (inwendig), waarmee deze op de filterkroes kan worden aangesloten (3.5).
- 3.7. Conisch afgeronde centrifugebuis van 10 ml, afsluitbaar.
- 3.8. Met calciumchloride gevulde exsiccator.

4. REAGENTIA

- 4.1. Kaliumhydroxideoplossing met een minimumgehalte van 85 %.

- 4.2. Kaliumhydroxideoplossing, ongeveer 2 M in ethanol.
Los 130 g kaliumhydroxide (4.1) onder koeling op in 200 ml gedistilleerd water en vul aan tot 1 liter met ethanol (4.7). Bewaar de oplossing maximaal twee dagen in goed afgesloten flessen van donker glas.
- 4.3. Ethylether, p.a.
- 4.4. Natriumsulfaat, p.a., watervrij.
- 4.5. Aceton, voor chromatografische doeleinden.
- 4.6. Ethylether, voor chromatografische doeleinden.
- 4.7. Ethanol, p.a.
- 4.8. Ethylacetaat, p.a.
- 4.9. Interne standaard: α -cholestanol, zuiverheid meer dan 99 % (zuiverheid moet worden gecontroleerd door gaschromatografische analyse).
- 4.10. α -cholestanoloplossing (interne standaard), 0,2 % (m/v) oplossing in ethylacetaat (4.8).
- 4.11. Fenoltaleïne-oplossing, 10 g/l in ethanol (4.7).
- 4.12. 1-eicosanol, 0,1 % (m/v) oplossing in ethylacetaat (interne standaard).

5. WERKWIJZE

Breng in de kolf van 250 ml (3.1) met behulp van de injectiespuit van 500 μ l (3.4) een hoeveelheid α -cholestanol-oplossing (interne standaard) (4.10) en een hoeveelheid 1-eicosanol (4.12) in die een hoeveelheid cholestanol en eicosanol bevat die overeenkomt met ongeveer 10 % van het sterol- en het alcoholgehalte van het monster. Bijvoorbeeld: voeg voor een monster olijfolie van 5 g 500 μ l α -cholestanoloplossing (4.10) en 250 μ l 1-eicosanol-oplossing (4.12) toe. Voor olie uit perskoeken van olijven: voeg 1 500 μ l α -cholestanoloplossing (4.10) en 1 500 μ l 1-eicosanoloplossing (4.12) toe. Damp met behulp van een lichte stikstofstroom droog in een warmwaterbad. Weeg na afkoeling van de kolf in dezelfde kolf 5,00 \pm 0,01 g van het gedroogde gefiltreerde monster af.

Opmerking 1: Dierlijke of plantaardige oliën en vetten die een aanmerkelijke hoeveelheid cholesterol bevatten, kunnen een piek vertonen met dezelfde retentietijd als cholestanol. Is dit het geval, dan moet de sterolfraction tevens zonder interne standaard worden geanalyseerd.

Voeg 50 ml 2 M ethanolische kaliumhydroxideoplossing (4.2) met wat puimsteen toe, bevestig de refluxkoeler en verhit tot zachtjes koken tot de verzeping heeft plaatsgevonden (de oplossing wordt helder). Verhit verder gedurende 20 minuten, voeg dan 50 ml gedistilleerd water toe via de bovenkant van de koeler, verwijder de koeler en laat de kolf afkoelen tot ongeveer 30 °C.

Breng de inhoud van de kolf kwantitatief over in een 500 ml scheitrechter (3.2), met behulp van meerdere porties gedistilleerd water (50 ml). Voeg ongeveer 80 ml ethylether (4.6) toe, schud krachtig gedurende ongeveer 60 seconden, waarbij u regelmatig de druk laat ontsnappen door de scheitrechter om te keren en de plugkraan te openen. Laat de oplossing staan tot de twee fasen volledig gescheiden zijn (opmerking 2). Laat de zeepoplossing daarna zo volledig mogelijk in een tweede scheitrechter lopen. Herhaal de extractie van de water-alcohollaag twee keer op dezelfde manier en gebruik hierbij telkens 60-70 ml ethylether (4.6).

Opmerking 2: Eventuele emulsies kunnen worden vernietigd door kleine hoeveelheden ethanol (4.7) toe te voegen.

Verzamel de drie etherextracten in een scheitrechter met 50 ml water. Ga verder met wassen met water (50 ml) tot het waswater niet meer roze kleurt na toevoeging van een druppel fenoltaleïne-oplossing (4.11). Verwijder het waswater en filtreer over watervrij natriumsulfaat (4.4) in een van tevoren gewogen kolf van 250 ml, was de trechter en het filter na met kleine hoeveelheden ethylether (4.6).

Verdamp het oplosmiddel in een rotatieverdamper bij 30 °C onder vacuüm. Voeg 5 ml aceton (4.5) toe en verwijder het vluchtige oplosmiddel volledig in een lichte stikstofstroom. Droog het residu in de oven bij 103 \pm 2 °C gedurende 15 min. Laat afkoelen in de exsiccatoren en weeg tot de dichtsbijzijnde 0,1 mg.

DEEL 2

SCHEIDING VAN DE FRACTIES VAN DE ALCOHOLISCHE VERBINDINGEN

1. TOEPASSINGSGEBIED

De volgens deel 1 bereide onverzeepbare bestanddelen worden gefractioneerd in de verschillende alcoholische verbindingen, namelijk alifatische alcoholen, sterolen en triterpeendialcoholen (erytrodiol en uvaol).

2. PRINCIPE

De onverzeepbare bestanddelen kunnen worden gefractioneerd met behulp van gewone dunnelaagchromatografie (referentiemethode), waarbij de platen worden ontwikkeld en de overeenkomstige banden worden afgeschraapt en geëxtraheerd. Als alternatieve scheidingsmethode kan worden gebruikgemaakt van HPLC in een silicagelkolom met een uv-detector, waarna de verschillende fracties worden opgevangen. De alifatische en triterpeen-alcoholen en de sterolen en triterpeendialcoholen worden samen afgezonderd.

3. APPARATUUR

De gebruikelijke laboratoriumuitrusting en in het bijzonder het volgende:

- 3.1. Volledige uitrusting voor dunnelaagchromatografie met 20 × 20 cm glasplaten.
- 3.2. Ultravioletlamp met een golflengte van 366 of 254 nm.
- 3.3. Micro-injectiespuiten van 100 µL en 500 µL.
- 3.4. Filterkroes G3 (porositeit 15-40 µm) met een diameter van ongeveer 2 cm en een hoogte van ongeveer 5 cm, geschikt om onder vacuüm te filtreren en voorzien van een slijpstuk 12/21 (uitwendig).
- 3.5. Erlenmeyer van 50 ml, voorzien van een slijpstuk 12/21 (inwendig), waarmee deze op de filterkroes kan worden aangesloten (3.4).
- 3.6. Conisch afgeronde centrifugebuis van 10 ml, afsluitbaar.
- 3.7. Met calciumchloride gevulde exsiccator.
- 3.8. HPLC-systeem bestaande uit:
 - 3.8.1. Binaire pomp.
 - 3.8.2. Manuele of automatische injector, voorzien van een injectielus van 200 µL.
 - 3.8.3. Inline ontgasser.
 - 3.8.4. UV-VIS- of IR-detector.
- 3.9. HPLC-kolom (25 cm × 4 mm i.d.) met silicagel 60 (korrelgrootte 5 µm).
- 3.10. Spuitfilter van 0,45 µm.
- 3.11. Erlenmeyer van 25 ml.

4. REAGENTIA

- 4.1. Kaliumhydroxideoplossing met een minimumgehalte van 85 %.
- 4.2. Kaliumhydroxideoplossing, ongeveer 2 M in ethanol.

Los 130 g kaliumhydroxide (4.1) onder koeling op in 200 ml gedistilleerd water en vul aan tot 1 liter met ethanol (4.9). Bewaar de oplossing maximaal twee dagen in goed afgesloten flessen van donker glas.
- 4.3. Ethylether, p.a.
- 4.4. Kaliumhydroxideoplossing, ongeveer 0,2 M in ethanol.

Los 13 g kaliumhydroxide (4.1) op in 20 ml gedistilleerd water en vul aan tot 1 liter met ethanol (4.9).
- 4.5. Glasplaten (20 × 20 cm) gecoat met silicagel, zonder fluorescentie-indicator, met een dikte van 0,25 mm (deze zijn gebruiksklaar in de handel te verkrijgen).
- 4.6. Aceton, voor chromatografische doeleinden.

- 4.7. n-hexaan, voor chromatografische doeleinden.
 - 4.8. Ethylether, voor chromatografische doeleinden.
 - 4.9. Ethanol, p.a.
 - 4.10. Ethylacetaat, p.a.
 - 4.11. Dunnelaagchromatografische (TLC) referentieoplossing: cholesterol, fytoosterolen, alcoholen en een 5 %-oplossing van erythrodiol in ethylacetaat (4.10).
 - 4.12. 2,7-dichloorfluoresceïne, 0,2 % oplossing in ethanol. Deze oplossing moet licht basisch worden gemaakt door toevoeging van enkele druppels 2 M alcoholische kaliumhydroxideoplossing (4.2).
 - 4.13. Mengsel van n-hexaan (4.7)/ethylether (4.8) met een 65:35-verhouding (v/v).
 - 4.14. HPLC-mobiele fase n-hexaan (4.7)/ethylether (4.8) (1:1) (v/v).
5. REFERENTIEMETHODE: SCHEIDING VAN DE ALCOHOLISCHE VERBINDINGEN MET BEHULP VAN DUNNELAAGCHROMATOGRAPHIE (TLC) MET BASISCHE PLATEN

Bereiding van de basische platen voor dunnelaagchromatografie: dompel de silicagelplaten (4.5) gedurende 10 seconden ongeveer 4 cm in de 0,2 M ethanolische kaliumhydroxideoplossing (4.4), laat de platen gedurende twee uur in een zuurkast drogen en plaats ze ten slotte gedurende één uur in een stoof bij 100 °C.

Verwijder de platen uit de stoof en bewaar ze tot het moment van gebruik in een met calciumchloride gevulde exsiccator (3.7) (op deze manier bereide platen moeten binnen 15 dagen worden gebruikt).

Breng een mengsel van hexaan/ethylether (4.13) (opmerking 3) in de ontwikkeltank, tot een hoogte van ongeveer 1 cm. Sluit de tank af met een geschikt deksel en laat hem gedurende minstens een halfuur staan op een koele plaats zodat een vloeistof-dampevenwicht kan worden bereikt. Stroken filtreerpapier, hangend in de loopvloeistof, kunnen tegen de binnenkant van de tank worden bevestigd. Dit bekort de benodigde ontwikkeltijd met ongeveer een derde en zorgt tevens voor een meer uniforme en regelmatige elutie van de componenten.

Opmerking 3: Bij elke bepaling dient de loopvloeistof te worden verversd om volkomen reproduceerbare elutiecondities te verwezenlijken. Als alternatief kan een mengsel van n-hexaan/ethylether, 50:50 (v/v), worden gebruikt.

Bereid een oplossing van ongeveer 5 % van de volgens deel 1 bereide onverzeepbare bestanddelen in ethylacetaat (4.10) en breng hiervan aan de onderkant van de chromatografische plaat (2 cm) (4.5) met behulp van de 100 µl micro-injectiespuit (3.3) 0,3 ml aan in een dunne uniforme lijn. Breng op dezelfde hoogte tevens 2-3 µl aan van de referentieoplossing (4.11) zodat de sterol-, triterpeendialcohol- en alcoholbanden na de ontwikkeling kunnen worden geïdentificeerd.

Plaats de plaat in de ontwikkeltank (3.1). De omgevingstemperatuur dient te liggen tussen 15 en 20 °C (opmerking 4). Sluit de tank onmiddellijk af met het deksel en laat elueren tot het vloeistoffront tot ongeveer 1 cm van de bovenkant van de plaat is gekomen. Verwijder de plaat uit de tank en laat de loopvloeistof verdampen in een hete luchtstroom of door de plaat gedurende korte tijd in een zuurkast te zetten.

Opmerking 4: Een hogere temperatuur kan de scheiding verergeren.

Besproei de plaat licht en uniform met de 2,7-dichloorfluoresceïneoplossing (4.12) en laat drogen. De sterol-, triterpeendialcohol- en alcoholbanden kunnen door bekijken onder een ultravioletlamp (3.2) worden geïdentificeerd aangezien deze op dezelfde hoogte liggen als de vlek van de referentieoplossing (4.11). Markeer de grenzen van de banden aan de zijkanten van de fluorescentie met een zwart potlood (zie de plaat voor dunnelaagchromatografie in afbeelding 1).

Schraap met een metalen spatel de silicagel in het gemarkeerde gebied af. Breng het afgeschraapte, fijngemaakte materiaal over in de filterkroes (3.4). Voeg 10 ml heet ethylacetaat (4.10) toe, meng zorgvuldig met de metalen spatel en filtreer, indien nodig onder vacuüm. Verzamel het filtraat in de erlenmeyer (3.5), verbonden aan de filterkroes.

Was het residu in de filterkroes driemaal met ethylether (4.3) (telkens ongeveer 10 ml), vang het filtraat op in dezelfde kolf die is verbonden aan de kroes. Damp het filtraat in tot een volume van 4-5 ml, breng de resterende oplossing over in de van tevoren gewogen 10 ml centrifugebuis (3.6), damp droog door voorzichtige verwarming in een zachte stikstofstroom, voeg enkele druppels aceton (4.6) toe, damp weer droog. Het in de centrifugebuis aanwezige materiaal bestaat uit de sterol- en triterpeendialcoholfracties of de alcohol- en triterpeenalcoholfracties.

6. SCHEIDING VAN DE ALCOHOLFRACTIE MET BEHULP VAN HPLC

Los de volgens deel 1 verkregen onverzeepbare bestanddelen op in 3 ml van de mobiele fase (4.14), filter de oplossing met een spuitfilter (3.10) en zet opzij.

Injecteer 200 µl van de gefilterde onverzeepbare oplossing in de HPLC (3.8).

Pas HPLC-scheiding toe bij een loopsnelheid van 0,8 ml/min, gooi het eluaat van de eerste 5 minuten weg en vang het eluaat tussen 5 en 10 minuten voor alifatische en triterpeenalcoholen en tussen 11 en 25 minuten voor sterolen en erytrodiol en uavol op in erlenmeyers van 25 ml (3.11) (opmerking 5).

De scheiding kan worden gecontroleerd met een uv-detector bij een golflengte van 210 nm of een refractieve indexdetector (zie figuur 6).

De fracties worden drooggedampt en klaargemaakt voor de chromatografische analyse.

Opmerking 5: Controleer zorgvuldig de druk van de HPLC-pomp, de ethylether kan de druk immers doen toenemen. Pas de doorloopsnelheid aan om de druk onder controle te houden.

DEEL 3

GASCHROMATOGRAFISCHE ANALYSE VAN DE FRACTIES VAN DE ALCOHOLISCHE VERBINDINGEN

1. TOEPASSINGSGEBIED

Dit deel bevat richtsnoeren voor de kwalitatieve en kwantitatieve gaschromatografische bepaling met capillaire kolom van de alcoholische verbindingen die overeenkomstig de in deel 2 vermelde methode zijn afgezonderd.

2. PRINCIPE

De met behulp van TLC of HPLC van de onverzeepbare bestanddelen verzamelde fracties worden gederivatiseerd tot trimethylsilylethers en via capillaire gaschromatografie met splitinjectie en een vlamionisatiedetector geanalyseerd.

3. APPARATUUR

De gebruikelijke laboratoriumuitrusting en in het bijzonder het volgende:

- 3.1. Conisch afgeronde centrifugebuis van 10 ml, afsluitbaar.
- 3.2. Gaschromatograaf, geschikt voor het werken met een capillaire kolom, voorzien van een splitsysteem bestaande uit:
 - 3.2.1. Een gethermostatiseerde ruimte waarmee de kolommen op de gewenste temperatuur kunnen worden gehouden met een nauwkeurigheid van ± 1 °C;
 - 3.2.2. een temperatuurgeregelde injectie-eenheid met een gepersilaniseerd glazen verdampingselement en splitsysteem;
 - 3.2.3. een vlamionisatiedetector (FID);
 - 3.2.4. een gegevensverzamelsysteem dat geschikt is voor gebruik met de FID (3.10.3), geschikt voor handmatige integratie.
- 3.3. Fused-silica capillaire kolom met een lengte van 20-30 m, inwendige diameter 0,25-0,32 mm, inwendig gecoat met 5 % difenyl-95 % simethylpolysiloxaan (SE-52 of SE-54 stationaire fase of equivalent) in een uniforme dikte tussen 0,10 en 0,30 µm.
- 3.4. Gaschromatografische micro-injectiespuit van 10 µl met een geharde naald voor splitinjectie.

4. REAGENTIA

- 4.1. Pyridine, watervrij, voor chromatografische doeleinden.
- 4.2. Hexamethyldisilazaan, p.a.
- 4.3. Trimethylchloorsilaan, p.a.

- 4.4. Standaardoplossingen van steroltrimethylsilylethers. Direct vóór gebruik te bereiden uit sterolen en erytrodiol verkregen uit oliën die deze bevatten.
- 4.5. Standaardoplossingen van de trimethylsilylethers van de C20-C28 alifatische alcoholen. Deze kunnen direct vóór gebruik worden bereid uit een mengsel van zuivere alcoholen.
- 4.6. Draaggas: waterstof of helium, gaschromatografisch zuiver.
- 4.7. Hulpgas: waterstof, helium, stikstof en lucht, gaschromatografisch zuiver.
- 4.8. Silyleringsreagens, bestaande uit een mengsel van pyridine/hexamethylsilazaan/trimethylchloorsilaan 9:3:1 (v/v/v).
- 4.9. n-hexaan, voor chromatografische doeleinden.

5. BEREIDING VAN DE TRIMETHYLSILYLETHERS

Voeg aan de in de centrifugebuis (3.1) aanwezige alcoholische verbindingen een hoeveelheid silyleringsreagens (4.8) (opmerking 6) toe, waarbij voor elke mg alcoholische bestanddelen 50 µl wordt toegevoegd. Vermijd hierbij bevochtiging (opmerking 7).

Opmerking 6: Deze oplossing is kant-en-klaar in de handel verkrijgbaar. Andere silyleringsreagentia zijn ook beschikbaar, zoals bijvoorbeeld bistrimethylsilyltrifluoacetamide + 1 % trimethylchloorsilaan, wat moet worden verdund met een gelijk volume watervrije pyridine. Pyridine kan worden vervangen door dezelfde hoeveelheid acetonitril.

Opmerking 7: De lichte opaalachtige weerschijn die kan worden gevormd, is normaal en veroorzaakt geen afwijking. De vorming van witte vlokken of de verschijning van een roze kleur zijn aanwijzingen voor de aanwezigheid van vocht of van veroudering van het reagens. In deze gevallen moet opnieuw worden begonnen (alleen wanneer hexamethylsilazaan/trimethylchloorsilaan wordt gebruikt).

Sluit de centrifugebuis (3.1), schud voorzichtig (zonder de buis om te draaien) tot de verbindingen volledig zijn opgelost. Laat ten minste 15 minuten staan bij kamertemperatuur en centrifugeer enkele minuten. De heldere oplossing is gereed voor de gaschromatografische analyse.

6. GASCHROMATOGRAFISCHE ANALYSE

6.1. Voorbereidende werkzaamheden, conditionering van de capillaire kolom

Bevestig de kolom (3.3) in de gaschromatograaf, waarbij het inlaatstuk wordt aangesloten aan het splitsysteem en het uiteinde aan de detector.

Voer de gebruikelijke controle uit van het gaschromatografische systeem (lekkage in de gasvoorziening, detectorefficiëntie, efficiëntie van het splitsysteem en van het recordersysteem enz.).

Indien de kolom voor de eerste keer wordt gebruikt, is het aangeraden deze te conditioneren. Laat een kleine gasstroom door de kolom gaan, zet de gaschromatografische eenheid aan en verwarm geleidelijk tot een temperatuur van ten minste 20 °C boven de bij de analyse gebruikelijke temperatuur (opmerking 8). Houd deze temperatuur aan gedurende ten minste twee uur, stel vervolgens de hele apparatuur in gebruik (regeling van de gassnelheid en het splitsysteem, ontsteking van de vlam, aansluiting van het computersysteem, regeling van de temperatuur van de kolomruimte, de detector en de injector enz.) en registreer het signaal met een gevoeligheid die ten minste twee keer groter is dan gebruikelijk bij de analyse. De basislijn moet lineair zijn, zonder enige piek en mag niet verlopen. Een rechtlijnig negatief verloop vormt een indicatie voor lekkage bij de kolomverbindingen; een positief verloop wijst op een onvoldoende conditionering van de kolom.

Opmerking 8: De temperatuur van het conditioneren moet altijd ten minste 20 °C lager zijn dan de maximumtemperatuur die voor de gebruikte stationaire fase is aangegeven.

6.2. Bedrijfsomstandigheden

Optimaliseer het temperatuurprogramma en het debiet van het draaggas zodanig dat chromatogrammen worden verkregen die vergelijkbaar zijn met die in de figuren 3 tot en met 6.

De volgende parameters zijn getest en nuttig bevonden:

6.2.1. Alifatische alcoholen

Ovenprogramma	180 °C (8 min.) → 260 °C (5 °C/min) → 260 °C (15 min.)
Injectortemperatuur	280 °C
Detectortemperatuur	290 °C
Lineaire snelheid van het draaggas	Helium (20-30 cm/s); waterstof (30-50 cm/s)
Splitverhouding	van 1:50 tot 1:100
Geïnjecteerd volume	0,5-1 µl TMSE-oplossing

6.2.2. Sterolen en triterpeendialcoholen

Ovenprogramma	260 ± 5 °C, isothermische omstandigheden
Injectortemperatuur	280-300 °C
Detectortemperatuur	280-300 °C
Lineaire snelheid van het draaggas	Helium (20-30 cm/s); waterstof (30-50 cm/s)
Splitverhouding	van 1:50 tot 1:100
Geïnjecteerd volume	0,5-1 µl TMSE-oplossing

Deze omstandigheden kunnen worden gewijzigd, afhankelijk van de karakteristieken van de kolom en de gaschromatograaf zodat chromatogrammen worden verkregen die aan de volgende eisen voldoen:

- De retentietijd van de C26-alcohol moet ongeveer 18 ± 5 minuten zijn.
- De piek van de C22-alcohol moet de volgende grootte hebben: voor olijfolie 80 ± 20 % volle schaaluitslag en voor olie uit perskoeken van olijven 40 ± 20 % volle schaaluitslag.
- De retentietijd van de β-sitosterolpiek moet ongeveer 20 ± 5 minuten zijn.
- De campesterolpiek moet de volgende grootte hebben: voor olijfolie (gemiddeld gehalte 3 %) 20 ± 5 % volle schaaluitslag.
- Alle aanwezige sterolen moeten gescheiden zijn. Daarnaast moeten andere pieken volledig gescheiden zijn, dat wil zeggen dat het signaal tussen pieken volledig naar de basislijn moet terugkeren. Onvolledige scheiding kan echter getolereerd worden mits de piek met een relatieve retentietijd van 1,02 (sitostanol) met behulp van een loodlijn kan worden gekwantificeerd.

6.3. Bepaling

Zuig in de 10 µl microinjectiespuit (3.4) 1 µl hexaan, 0,5 µl lucht en ten slotte 0,5-1,0 µl monsteroplossing. Trek de plunjer van de spuit zo ver uit dat de naald leeg is. Penetreeer met de naald het membraan van de injector en injecteer snel na 1-2 seconden, verwijder daarna voorzichtig na ongeveer 5 seconden de naald. Er kan ook een automatische injector worden gebruikt.

Neem het chromatogram op tot de TMSE van de aanwezige overeenkomstige alcoholische verbindingen volledig zijn geëluëerd. De basislijn moet blijven voldoen aan de eisen van de overeenkomstige bedrijfsomstandigheden (6.2.1 of 6.2.2).

6.4. Identificatie van de pieken

Identificeer de individuele pieken op basis van de retentietijden en door een vergelijking met de mengsels van TMSE van de alifatische en triterpeenalcoholen en van de sterolen en triterpeendialcoholen die onder dezelfde omstandigheden zijn geanalyseerd. In figuur 3 wordt een chromatogram van de fractie van alifatische en triterpeenalcoholen getoond en in figuur 2 worden het overeenkomstige chromatogram voor sterolen en triterpeendialcoholen getoond.

De alifatische alcoholen worden geëluëerd in de volgende volgorde: C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol en C28-ol.

De sterolen en triterpeendialcoholen worden geëluëerd in de volgende volgorde: cholesterol, brassicasterol, ergosterol, 24-methyleencholesterol, campesterol, campestanol, stigmasterol, Δ^7 -campesterol, $\Delta^5,23$ -stigmastadienol, clerosterol, β -sistosterol, sitostanol, Δ^5 -avenasterol, $\Delta^5,24$ -stigmastadienol, Δ^7 -stigmastanol, Δ^7 -avenasterol, erythrodiol en uvaol.

6.5. Berekening

Bereken met een gegevensverzamelingsysteem de piekoppervlakten van 1-eicosanol en de alifatische alcoholen C22, C24, C26 en C28. De responsfactor van 1-eicosanol wordt op 1 gesteld.

Bereken met behulp van het computersysteem het oppervlak van de pieken van het α -cholestanol en de sterolen en triterpeendialcoholen. Houd geen rekening met pieken van stoffen die niet (ergosterol hoeft niet te worden berekend) op de lijst van tabel 1 voorkomen. De responsfactor van α -cholestanol wordt op 1 gesteld.

Bereken de concentratie van elke individuele alcoholische verbinding in mg/kg vethoudend materiaal als volgt:

$$\text{Alcoholische verbinding } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1000$$

waarbij:

A_x = piekoppervlak van alcoholisch bestanddeel x, in computersysteemeenheden

A_s = oppervlak van de 1-eicosanol/ α -cholestanolpiek, in computersysteemeenheden

m_s = massa van het toegevoegde 1-eicosanol/ α -cholestanol, in milligram

m = massa van het onderzochte monster, in gram

7. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Geef de gehalten van de individuele alifatische en triterpeenalcoholen op in mg/kg vethoudend materiaal en hun som als "totaalgehalte aan alifatische alcoholen". Het totaalgehalte is de som van C22, C24, C26 en C28.

De samenstelling van alle individuele alcoholische verbindingen moet worden uitgedrukt met één cijfer na de komma.

De totale concentratie van sterolen moet worden uitgedrukt zonder cijfers na de komma.

Het percentage van elk individueel sterol wordt berekend door de verhouding te bepalen tussen het betrokken piekoppervlak en de som van de piekoppervlakken van de sterolen:

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

waarbij:

A_x = piekoppervlak van sterol x

ΣA = som van de piekoppervlakken van alle sterolen

Kennelijke β -sitosterol: $\Delta^5,23$ -stigmastadienol + clerosterol + β -sitosterol + sitostanol + Δ^5 -avenasterol + $\Delta^5,24$ -stigmastadienol

Berekenen van het percentage erytrodiol en uvaol:

$$\text{erytrodiol} + \text{uvaol} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

waarbij:

A_{Er} = oppervlak van erytrodiol in computersysteemstellingen

A_{Uv} = oppervlak van uvaol in computersysteemstellingen

ΣA_T = totale oppervlak voor sterolen + erytrodio + uavol in computersysteemstellingen

Naast de berekening van het relatieve percentage van individuele sterolen en triterpeendialcoholen en van de totale concentratie van sterolen, moeten ook de concentratie van erytrodiol en van uavol, en de som daarvan, uitgedrukt in mg/kg vethoudend materiaal, worden berekend, volgens de volgende formule:

$$\text{Erythrodiol} = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$\text{Uvaol} = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

waarbij:

A_{Er} = piekoppervlak van erytrodiol in computersysteemstellingen

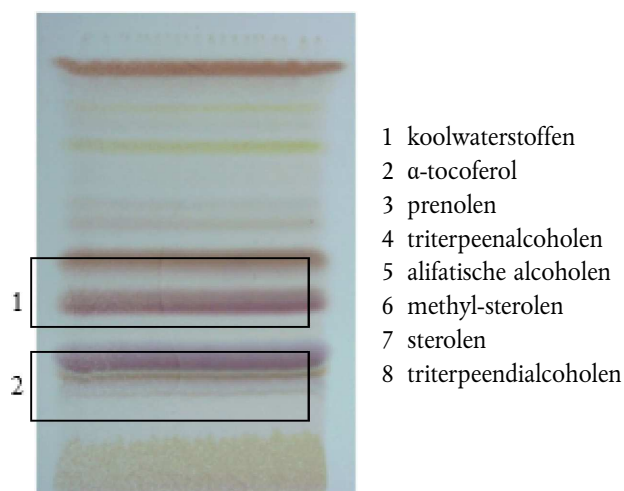
A_{Uv} = oppervlak van uvaol in computersysteemstellingen

A_s = oppervlak van de α -cholestanolpiek, in computersysteemeenheden

m_s = massa van het toegevoegde α -cholestanol, in milligram

m = massa van het onderzochte monster, in gram

Aanhangsel

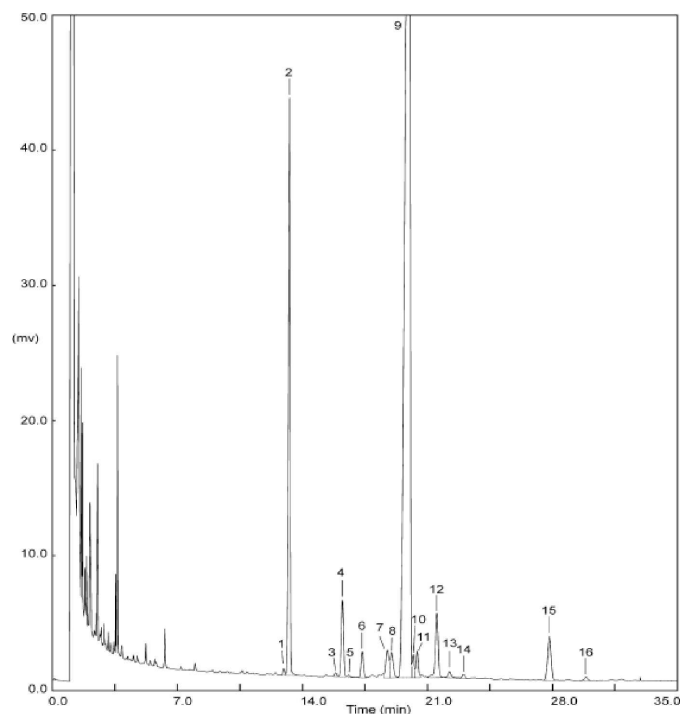


Figuur 1 — TLC van de onverzeepbare fractie van olie uit perskoeken van olijven, tweemaal geëluëerd met hexaan:diethylether (65:35), ontwikkeld met SO₄H₂ (50 %) en verwarmd. De af te schrapen banden liggen in rechthoek 1 voor alifatische alcoholen en in rechthoek 2 voor sterolen en triterpeendialcoholen.

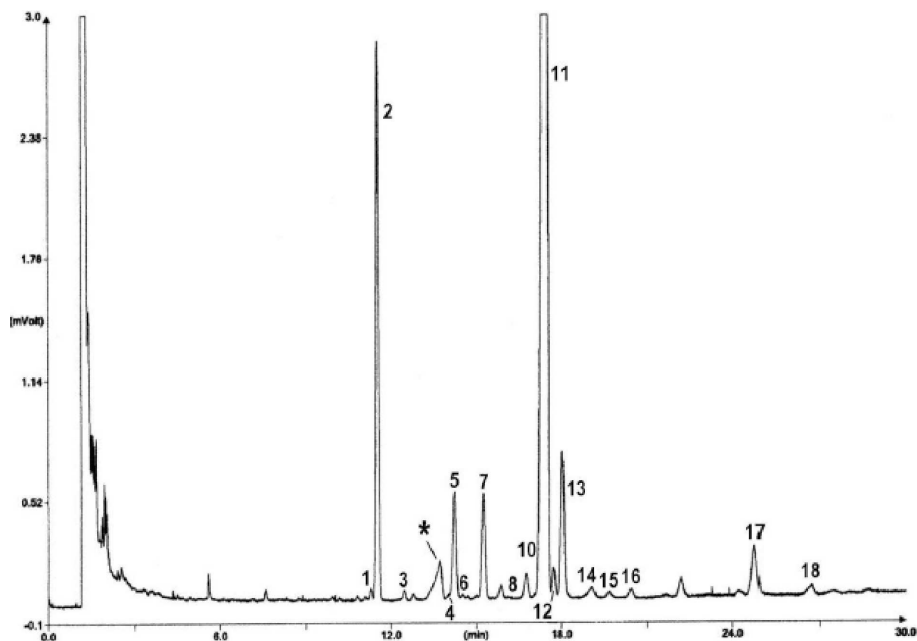
Tabel I — relatieve retentietijden voor de sterolen

Piek	Identificatie		Relatieve retentietijd	
			SE 54-kolom	SE 52-kolom
1	Cholesterol	Δ^5 -cholesteen-3 β -ol	0,67	0,63
2	Cholestanol	5 α -cholestaan-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brassicasterol	[24S]-24-methyl- $\Delta^5,22$ -cholestadien-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-methyl- $\Delta^5,7,22$ cholestatrien-3 β -ol	0,78	0,76
4	24-methyleencholesterol	24-methyleen- $\Delta^5,24$ -cholestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	Campesterol	(24R)-24-methyl- Δ^5 -cholesteen-3 β -ol	0,83	0,81
6	Campestanol	(24R)-24-methyl-cholestaan-3 β -ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	(24S)-24-ethyl- $\Delta^5,22$ -cholestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ^7 -campesterol	(24R)-24-methyl- Δ^7 -cholesteen-3 β -ol	0,93	0,92
9	$\Delta^5,23$ -stigmastadienol	(24S)-24-ethyl- $\Delta^5,23$ -cholestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	Clerosterol	(24S)-24-ethyl- $\Delta^5,25$ -cholestadien-3 β -ol	0,96	0,96

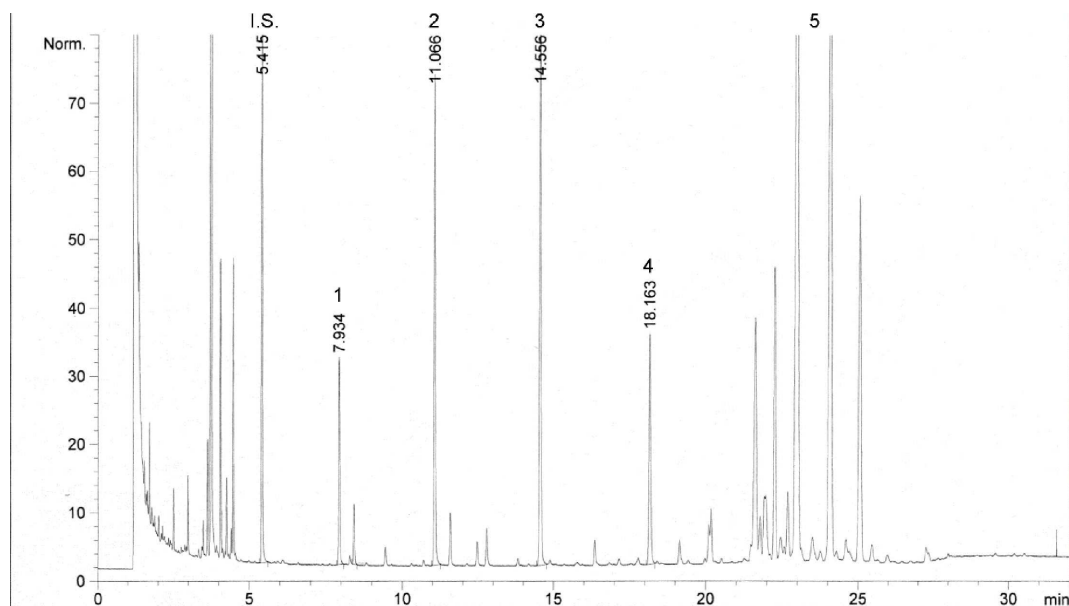
Piek	Identificatie		Relatieve retentietijd	
			SE 54-kolom	SE 52-kolom
11	β -sitosterol	(24R)-24-ethyl- Δ 5-cholesteen-3 β -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-ethyl-cholestaan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ 5-avenasterol	(24Z)-24-ethylideen- Δ -cholesteen-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5,24-stigmastadienol	(24R,S)-24-ethyl- Δ 5,24-cholestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ 7-stigmastenol	(24R,S)-24-ethyl- Δ 7-cholesteen-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterol	(24Z)-24-ethylideen- Δ 7-cholesteen-3 β -ol	1,16	1,16
17	Erytrodiol	5 α -oleaan-12-en-3 β ,28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-urseen-3 β ,28-diol	1,52	1,52



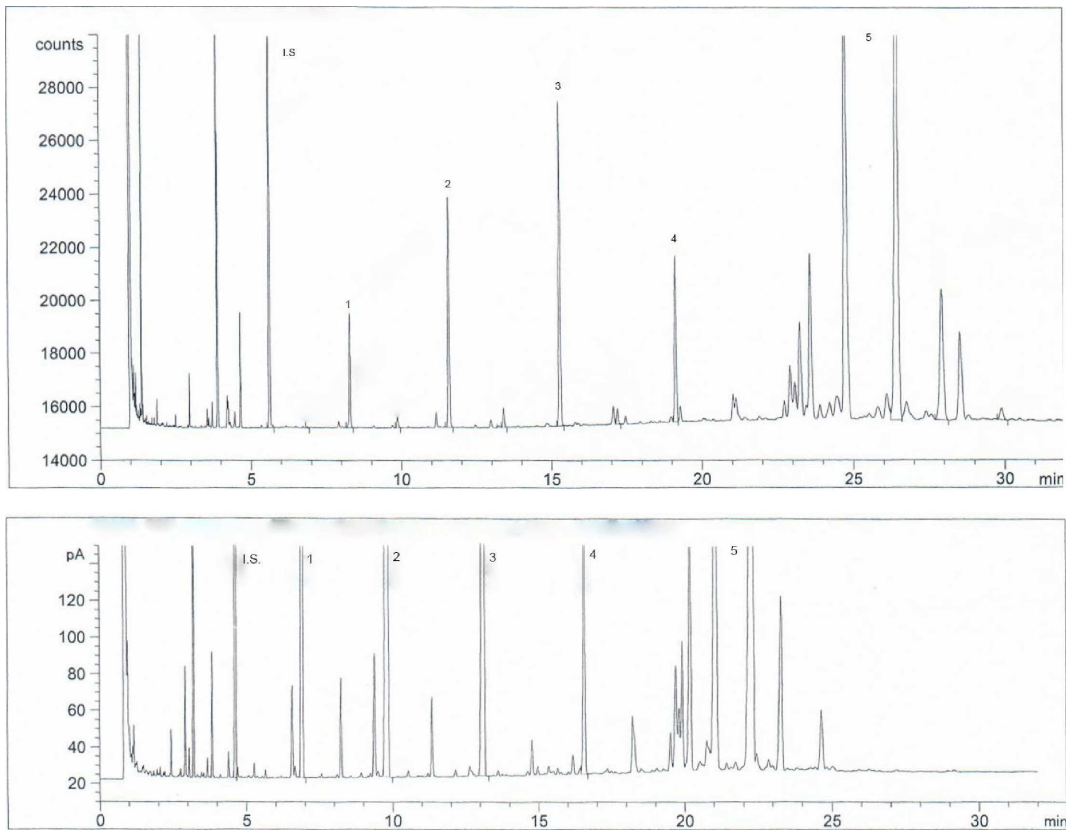
Figuur 2 — Met behulp van GC-FID verkregen chromatografisch profiel van sterolen en triterpeendialcoholen van geraffineerde olijfolie. (1) Cholesterol, (2) α -cholestanol (I.S.), (3) 24-methyleencholesterol, (4) campesterol, (5) campestanol, (6) stigmasterol, (7) Δ 5,23-stigmastadienol, (8) clerosterol, (9) β -sitosterol, (10) sitostanol, (11) Δ 5-avenasterol, (12) Δ 5,24-stigmastadienol, (13) Δ 7-stigmastenol, (14) Δ 7-avenasterol, (15) erytrodiol, (16) uvaol.



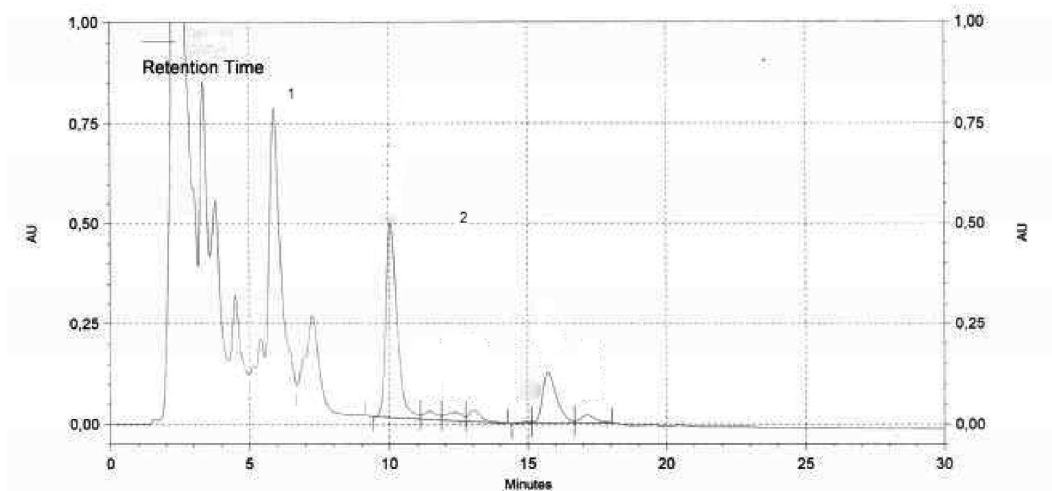
Figuur 3 — Met behulp van GC-FID verkregen chromatografisch profiel van sterolen en triterpeendialcoholen van een olijfolie voor verlichting. (1) Cholesterol, (2) α -cholestanol (I.S.), (3) brassicasterol, (4) 24-methyleencholesterol, (5) campesterol, (6) campestanol, (7) stigmasterol, (8) Δ^7 -campesterol, (9) $\Delta^5,23$ -stigmastadienol, (10) clerosterol, (11) β -sitosterol, (12) sitostanol, (13) Δ^5 -avenasterol, (14) $\Delta^5,24$ -stigmastadienol, (15) Δ^7 -stigmastenol, (16) Δ^7 -avenasterol, (17) erythrodiol, (18) uvaol.



Figuur 4 — Met behulp van GC-FID verkregen chromatografisch profiel van alifatische en triterpeenalcoholen van olijfolie. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) triterpeenalcoholen.



Figuur 5 — Met behulp van GC-FID verkregen chromatografisch profiel van alifatische en triterpeenalcoholen van een geraffineerde olijfolie en een bij de tweede centrifugering verkregen olijfolie. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) triterpeenalcoholen.



Figuur 6 — HPLC-chromatogram van de onverzeepbare fractie van een olijfolie, gescheiden met behulp van HPLC met een uv-detector. (1) Alifatische en triterpeenalcoholen; (2) sterolen en triterpencilcoholen”