

Dit document vormt slechts een documentatiehulpmiddel en verschijnt buiten de verantwoordelijkheid van de instellingen

► **B** **VERORDENING (EEG) Nr. 2568/91 VAN DE COMMISSIE**
van 11 juli 1991

**inzake de kenmerken van olijfoliën en oliën uit afvalfen van olijven en de desbetreffende analyse-
methoden**

(PB L 248 van 5.9.1991, blz. 1)

Gewijzigd bij:

	Publicatieblad		
	nr.	blz.	datum
► M1 Verordening (EEG) nr. 3682/91 van de Commissie van 17 december 1991	L 349	36	18.12.1991
► M2 Verordening (EEG) nr. 1429/92 van de Commissie van 26 mei 1992	L 150	17	2.6.1992
► M3 Verordening (EEG) Nr. 1683/92 van de Commissie van 29 juni 1992	L 176	27	30.6.1992
► M4 Verordening (EEG) nr. 1996/92 van de Commissie van 15 juli 1992	L 199	18	18.7.1992
► M5 Verordening (EEG) nr. 3288/92 van de Commissie van 12 november 1992	L 327	28	13.11.1992
► M6 Verordening (EEG) nr. 183/93 van de Commissie van 29 januari 1993	L 22	58	30.1.1993
► M7 gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 826/93 van de Commissie van 6 april 1993	L 87	6	7.4.1993
► M8 Verordening (EEG) nr. 620/93 van de Commissie van 17 maart 1993	L 66	29	18.3.1993
► M9 Verordening (EG) nr. 177/94 van de Commissie van 28 januari 1994	L 24	33	29.1.1994
► M10 Verordening (EG) nr. 2632/94 van de Commissie van 28 oktober 1994	L 280	43	29.10.1994
► M11 Verordening (EG) Nr. 656/95 van de Commissie van 28 maart 1995	L 69	1	29.3.1995
► M12 Verordening (EG) nr. 2527/95 van de Commissie van 27 oktober 1995	L 258	49	28.10.1995
► M13 Verordening (EG) Nr. 2472/97 van de Commissie van 11 december 1997	L 341	25	12.12.1997
► M14 Verordening (EG) nr. 282/98 van de Commissie van 3 februari 1998	L 28	5	4.2.1998
► M15 Verordening (EG) nr. 2248/98 van de Commissie van 19 oktober 1998	L 282	55	20.10.1998
► M16 Verordening (EG) nr. 379/1999 van de Commissie van 19 februari 1999	L 46	15	20.2.1999
► M17 Verordening (EG) nr. 455/2001 van de Commissie van 6 maart 2001	L 65	9	7.3.2001
► M18 Verordening (EG) nr. 2042/2001 van de Commissie van 18 oktober 2001	L 276	8	19.10.2001
► M19 Verordening (EG) nr. 796/2002 van de Commissie van 6 mei 2002	L 128	8	15.5.2002

Gerectificeerd bij:

- **C1** Rectificatie PB L 176 van 20.7.1993, blz. 26 (183/93)



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**

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op Verordening nr. 136/66/EEG van de Raad van 22 september 1966 houdende de totstandbrenging van een gemeenschappelijke ordening der markten in de sector oliën en vetten⁽¹⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 3577/90⁽²⁾, en met name op artikel 35 bis,

Overwegende dat in de bijlage bij Verordening nr. 136/66/EEG de benamingen en definities zijn vastgesteld van olijfoliën en oliën uit afvallen van olijven die in elke Lid-Staat, in het kader van het handelsverkeer tussen de Lid-Staten onderling en in de handel met derde landen, worden verkocht;

Overwegende dat, onverminderd andere bestaande bepalingen ter zake, ter onderscheiding van de verschillende soorten olie, de fysisch-chemische kenmerken van elke soort en de organoleptische kenmerken van bij de eerste persing verkregen oliën dienen te worden bepaald, zodat zuiverheid en kwaliteit van de betrokken producten kunnen worden gewaarborgd;

Overwegende dat het dienstig is om de aanwezigheid van de kenmerken van de verschillende soorten olie in de gehele Gemeenschap op uniforme wijze te bepalen; dat daartoe communautaire methoden voor chemische analyse en organoleptische beoordeling dienen te worden vastgesteld; dat evenwel tijdens een overgangperiode het gebruik van andere in de Lid-Staten toegepaste analysemethoden moet worden toegestaan, met dien verstande dat in geval van uiteenlopende resultaten de uitkomsten van de communautaire methode doorslaggevend zijn;

Overwegende dat als gevolg van de bepaling van de fysisch-chemische kenmerken van de olijfoliën en de omschrijving van de analysemethoden de aanvullende aantekeningen van hoofdstuk 15 van de gecombineerde nomenclatuur aanpassing behoeven;

Overwegende dat in het kader van de methode voor de beoordeling van de organoleptische kenmerken van bij de eerste persing verkregen oliën „panels” van geselecteerde en getrainde proevers dienen te worden gevormd; dat derhalve de nodige tijd moet worden gelaten om een dergelijke structuur tot stand te brengen; dat, gezien de moeilijkheden die sommige Lid-Staten zullen hebben om proefpanels te vormen, dient te worden toegestaan dat op in andere Lid-Staten reeds bestaande proefpanels een beroep wordt gedaan;

Overwegende dat met het oog op de correcte werking van de regeling inzake de heffingen op de invoer van afvallen van olijven, een uniforme methode voor de bepaling van het oliegehalte van die producten dient te worden vastgesteld;

Overwegende dat het, om de handel niet te schaden, dienstig is een beperkte periode vast te stellen waarbinnen vóór de inwerkingtreding van deze verordening verpakte olie nog mag worden afgezet;

Overwegende dat Verordening (EEG) nr. 1058/77 van de Commissie⁽³⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 1858/88⁽⁴⁾, bijgevolg dient te worden ingetrokken;

⁽¹⁾ PB nr. 172 van 30. 9. 1966, blz. 3025/66.

⁽²⁾ PB nr. L 353 van 17. 12. 1990, blz. 23.

⁽³⁾ PB nr. L 128 van 24. 5. 1977, blz. 6.

⁽⁴⁾ PB nr. L 166 van 1. 7. 1988, blz. 10.

▼B

Overwegende dat het Comité van beheer voor oliën en vetten geen advies heeft uitgebracht binnen de door zijn voorzitter bepaalde termijn.

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

1. Als „bij de eerste persing verkregen olijfoliën” in de zin van punt 1, onder a), b) en c), van de bijlage bij Verordening nr. 136/66/EEG worden aangemerkt de oliën waarvan de respectieve kenmerken overeenkomen met die welke in bijlage I, punten 1, 2 en 3, van onderhavige verordening zijn vermeld.
2. Als „bij de eerste persing verkregen olijfolie voor verlichting” in de zin van punt 1, onder d), van de bijlage bij Verordening nr. 136/66/EEG wordt aangemerkt de olie waarvan de kenmerken overeenkomen met die welke in bijlage I, punt 4, van de onderhavige verordening zijn vermeld.
3. Als „geraffineerde olijfolie” in de zin van punt 2 van de bijlage bij Verordening nr. 136/66/EEG wordt aangemerkt de olie waarvan de kenmerken overeenkomen met die welke in bijlage I, punt 5, van de onderhavige verordening zijn vermeld.
4. Als „olijfolie” in de zin van punt 3 van de bijlage bij Verordening nr. 136/66/EEG wordt aangemerkt de olie waarvan de kenmerken overeenkomen met die welke in bijlage I, punt 6, van de onderhavige verordening zijn vermeld.
5. Als „ruwe olie uit afvallen van olijven” in de zin van punt 4 van de bijlage bij Verordening nr. 136/66/EEG wordt aangemerkt de olie waarvan de kenmerken overeenkomen met die welke in bijlage I, punt 7, van de onderhavige verordening zijn vermeld.
6. Als „geraffineerde olie uit afvallen van olijven” in de zin van punt 5 van de bijlage bij Verordening nr. 136/66/EEG wordt aangemerkt de olie waarvan de kenmerken overeenkomen met die welke in bijlage I, punt 8, van de onderhavige verordening zijn vermeld.
7. Als olie uit afvallen van olijven in de zin van punt 6 van de bijlage bij Verordening nr. 136/66/EEG wordt aangemerkt de olie waarvan de kenmerken overeenkomen met die welke in bijlage I, punt 9, van de onderhavige verordening zijn vermeld.

▼M15

8. Als „bij de eerste persing verkregen olijfoliën” in de zin van punt 1, onder a), b), c) of d), van de bijlage bij Verordening nr. 136/66/EEG worden voor de ►**M18** verkoopseizoenen 1998/1999 tot en met 2002/2003 ◀ evenwel ook aangemerkt, de onverpakte oliën of de in onmiddellijke verpakkingen met een netto-inhoud van 100 kg of meer verpakte oliën, die geheel van oorsprong uit Marokko zijn, waarvan de respectieve kenmerken overeenkomen met die welke in bijlage I, punten 1, 2, 3 en 4, van onderhavige verordening zijn vermeld en waarvan het gehalte aan linoleenzuur, in afwijking van het bepaalde in de leden 1 en 2, maximaal 1,0 % bedraagt.

▼B*Artikel 2*

1. De in bijlage I vastgestelde kenmerken van de oliën worden aan de hand van de volgende analysemethoden bepaald:
 - voor de bepaling van het gehalte aan vrije vetzuren, uitgedrukt in een percentage oliezuur, de in bijlage II beschreven methode;
 - voor de bepaling van het peroxidegetal, de in bijlage III beschreven methode;

▼M19

- voor de bepaling van het gehalte aan was, de in bijlage IV beschreven methode;

▼B

- voor de bepaling van de sterolsamenstelling, de in bijlage V beschreven methode;
- voor de bepaling van het erythrodiol- en uvaolgehalte, de in bijlage VI beschreven methode;
- voor de bepaling van het gehalte aan verzadigde vetzuren op de 2-positie van de triglyceriden, de in bijlage VII beschreven methode;
- voor de bepaling van het gehalte aan trilinoleïne, de in bijlage VIII beschreven methode;
- voor de spectrofotometrische analyse, de in bijlage IX beschreven methode;
- voor de bepaling van de vetzuursamenstelling, de in de bijlagen X.A en X.B beschreven methode;
- voor de bepaling van het gehalte aan gehalogeneerde oplosmiddelen, de in bijlage XI beschreven methode;
- voor de beoordeling van de organoleptische kenmerken van bij de eerste persing verkregen olijfolie, de in bijlage XII beschreven methode, toegepast overeenkomstig het bepaalde in lid 2;
- voor het bewijs van raffinage, de in bijlage XIII beschreven methode;

▼M11

- voor de bepaling van het gehalte aan stigmastadiënen, de in bijlage XVII beschreven methode;

▼M13

- voor de bepaling van de samenstelling van de triglyceriden met ECN42, de in bijlage XVIII beschreven methode;

▼M19

- voor de bepaling van het gehalte aan alifatische alcoholen, de in bijlage XIX beschreven methode.

2. De verificatie van de organoleptische kenmerken van bij de eerste persing verkregen olijfolie door de nationale autoriteiten of hun vertegenwoordigers wordt uitgevoerd door een door de lidstaten erkend proeverspanel.

De organoleptische kenmerken van in de eerste alinea genoemde olie zijn die van de voor de olijfolie opgegeven categorie wanneer een door de betrokken lidstaat erkend panel de indeling in die categorie bevestigt.

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 twee tegenanalyses door andere proeverspanels uitvoeren, waarvan minstens één door een panel dat 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. Zo niet, komen de kosten van de tegenanalyses, onverminderd andere sancties, voor rekening van de belanghebbende.

▼M17

3. Monsters voor de controle van de kenmerken van de in lid 1 bedoelde olie door de nationale autoriteiten of hun vertegenwoordigers worden genomen volgens de internationale normen EN ISO 661 en EN ISO 5555 met betrekking tot de voorbereiding van de monsters voor onderzoek en de monsterneming. In afwijking van punt 6.8 van norm EN ISO 5555, worden echter voor partijen van dergelijke oliën in onmiddellijke verpakkingen, met een inhoud van maximaal 100 liter, monsters genomen volgens bijlage I bis.

▼M19

Onverminderd de voorschriften van norm EN ISO 5555 en hoofdstuk 6 van norm EN 661, worden de monsters zo snel mogelijk tegen licht en hitte beschermd en:

- wat de periode oktober-mei betreft, uiterlijk op de tiende werkdag na de dag waarop ze zijn genomen, of
- wat de periode juni-september betreft, uiterlijk op de vijfde werkdag na de dag waarop ze zijn genomen,

▼ M19

voor analyse naar het laboratorium gezonden.

▼ M17

4. Voor de in lid 3 bedoelde verificatie worden de in de bijlagen II, III, IX en XII bedoelde analyses en in voorkomend geval de door de nationale wetgevingen voorgeschreven tegenexpertises uitgevoerd vóór de datum van minimale houdbaarheid. Indien het monster meer dan vier maanden vóór de datum van minimale houdbaarheid wordt genomen, moeten de analyses uiterlijk de vierde maand na de bemonstering worden verricht. Voor de andere in de genoemde verordening vermelde analyses is geen termijn van toepassing.

Als de resultaten van de analyses niet beantwoorden aan de kenmerken van de aangegeven categorie olijfolie of olie uit afvallen van olijven, wordt de betrokkene hiervan uiterlijk één maand vóór het verstrijken van de in de eerste alinea bedoelde termijn in kennis gesteld, tenzij het monster minder dan een maand vóór de datum van minimale houdbaarheid is genomen.

▼ M19

5. Voor de bepaling van de kenmerken van olijfolie volgens de in lid 1 aangegeven methoden worden de analyseresultaten rechtstreeks vergeleken met de in deze verordening vastgestelde grenswaarden.

▼ M5

*Artikel ► **M19** 3 ◀*

Wanneer wordt geconstateerd dat de organoleptische kenmerken van een bepaalde olie verschillen van die welke deze olie op grond van haar benaming zou moeten hebben, past de betrokken Lid-Staat, onverminderd de eventuele andere sancties, administratieve geldboetes toe, waarvan de hoogte wordt bepaald op basis van de ernst van de geconstateerde onregelmatigheid.

Voor de beoordeling van de onregelmatigheid wordt met name rekening gehouden met de natuurlijke ontwikkeling van de kenmerken van olie die onder normale omstandigheden is bewaard.

De Lid-Staten brengen de Commissie aan het begin van ieder halfjaar op de hoogte van het aantal en de aard van de geconstateerde onregelmatigheden alsmede van de in het voorafgaande halfjaar toegepaste sancties.

Artikel 4

▼ M19

1. Voor de beoordeling en controle van de organoleptische kenmerken door de nationale autoriteiten of hun vertegenwoordiger kunnen de lidstaten panels van proevers erkennen.

De erkenningsvoorwaarden worden door de lidstaten vastgesteld en wel zodanig dat:

- aan de voorwaarden van punt 4 van bijlage XII wordt voldaan;
- de voorzitter van het panel wordt opgeleid door een daartoe door de lidstaat erkende instelling en onder door de lidstaat goedgekeurde voorwaarden;
- de geldigheid van de erkenning afhankelijk wordt gemaakt van de resultaten van een jaarlijkse controle door de lidstaat.

Elke lidstaat stelt de Commissie in kennis van de lijst van erkende panels en van de overeenkomstig dit lid genomen maatregelen.

▼ M5

2. Ingeval een Lid-Staat op zijn grondgebied moeilijk een panel van proevers kan instellen, mag hij een beroep doen op een door een andere Lid-Staat erkend panel.

3. Elke Lid-Staat stelt de lijst op van de door beroepsorganisaties of sectorale organisaties overeenkomstig de in lid 1 vermelde voor-

▼ M5

waarden ingestelde panels van proevers en ziet toe op de naleving van deze voorwaarden.

▼ M19**▼ B***Artikel 6*

1. Het oliegehalte van afvallen van olijven en van de andere bij de winning van olijfolie verkregen afvallen (GN-codes 2306 90 11 en 2306 90 19) wordt bepaald overeenkomstig de in bijlage XV opgenomen methode.

2. Het in lid 1 bedoelde oliegehalte wordt uitgedrukt in gewichtspercenten berekend over de droge stof.

Artikel 7

Wat de aanwezigheid van andere ongewenste stoffen dan die bedoeld in bijlage XI betreft, gelden de communautaire bepalingen.

Artikel 8

1. Elke Lid-Staat stelt de Commissie van de ter uitvoering van deze verordening genomen maatregelen in kennis.

2. Elke Lid-Staat legt de Commissie aan het begin van elk halfjaar een verzamelstaat met de analyseresultaten van de in het voorgaande halfjaar uitgevoerde bepalingen over.

Deze resultaten worden volgens de procedure van artikel 39 van Verordening nr. 136/66/EEG door het Comité van beheer voor oliën en vetten onderzocht.

Artikel 9

Verordening (EEG) nr. 1058/77 wordt hierbij ingetrokken.

Artikel 10

1. Deze verordening treedt in werking op de derde dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen*.

De in bijlage XII beschreven methode wordt, behalve voor verrichtingen in het kader van de interventieregeling, met ingang van ► **M1** 1 november 1992 ◀ toegepast.

▼ M5

Deze methode geldt niet voor olijfolie van de eerste persing die vóór 1 november 1992 is verpakt.

▼ B

2. Deze verordening is niet van toepassing op olijfoliën en oliën uit afvallen van olijven die vóór de datum van inwerkingtreding van deze verordening zijn verpakt en tot en met 31 oktober 1992 worden verkocht.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke Lid-Staat.

▼B*BIJLAGEN***Inhoudsopgave**

- Bijlage I: Kenmerken van olijfolie ...
- ▼M17**
 Bijlage I bis: Bemonstering van partijen olijfolie en olie uit afval­len van olijven in onmiddellijke verpakkingen van ten hoogste 100 liter ...
- ▼B**
 Bijlage II: Bepaling van de zuurgraad ...
 Bijlage III: Bepaling van het peroxidegetal ...
 Bijlage IV: ►**M6** Bepaling van het gehalte aan was met behulp van capillaire gaschromatografie ◀ ...
 Bijlage V: Bepaling van de sterolsamenstelling en het sterolgehalte met behulp van capillaire gaschromatografie ...
 Bijlage VI: Bepaling van het gehalte aan erythrodiol en uvaol ...
 Bijlage VII: Bepaling van vetzuren op de 2-positie in triglyceriden van oliën en vetten ...
 Bijlage VIII: Bepaling van het gehalte aan trilinoleïne ...
 Bijlage IX: Spectrofotometrisch onderzoek in het ultraviolette gebied ...
 Bijlage X.A: Gaschromatografische analyse van methylesters van vetzuren ...
 Bijlage X.B: Bereiding van methylesters van vetzuren overeenkomstig bijlage VI, punten I en II, van Verordening (EEG) nr. 72/77 of volgens de hieronder beschreven methode ...
 Bijlage XI: Bepaling van het gehalte aan gehalogeneerde oplosmiddelen ...
 Bijlage XII: Organoleptische beoordeling van olijfolie van eerste persing ...
 Bijlage XIII: ►**M6** Neutralisering en ontkleuring van olijfolie in het laboratorium ◀ ...
- ▼M19**
-
- ▼B**
 Bijlage XV: Bepaling van het oliegehalte van de afval­len van olijven ...
 Bijlage XVI: Bepaling van het joodgetal ...
- ▼M11**
 Bijlage XVII: Methode voor de bepaling van de stigmastadiënen in plantaar­dige oliën ...
- ▼M13**
 Bijlage XVIII: Methode voor de bepalingen van de samenstelling van de triglyceriden met ECN42 ...
- ▼M19**
 Bijlage XIX: Methode voor de bepaling van het gehalte aan alifatische alcoholen ...

BILLAGI I

KENMERKEN VAN OLIJFOLIE

Categorie	Zuurgraad (%) (*)	Peroxide getal mEq O ₂ /kg (*)	Gehalogeneerde oplosmiddelen mg/kg (*) (1)	Was mg/kg (**)	Verzadigde vetzuren in 2-positie-triglyceriden (%)	Stigmastadiënen mg/kg (2)	Verskil tussen HPLC en theoretische berekening van ECN42	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	K ₂₇₀ met aluminiumoxide (3)	Delta-K (*)	Organoleptische beoordeling Mediaan voor de gebreken (Md) (*)	Organoleptische beoordeling Mediaan „fruitig” (Mf) (*)
1. Extra olijfolie verkregen bij de eerste persing	≤ 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. Olijfolie verkregen bij de eerste persing	≤ 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. Courante olijfolie verkregen bij de eerste persing	≤ 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. Olijfolie verkregen bij de eerste persing, voor verlichting	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 300 (5)	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	—	Md > 6	—
5. Geraffineerde olijfolie	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—	—
6. Olijfolie	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—	—
7. Ruwe olie uit afvalfen van olijfen	> 0,5 (**)	—	—	> 350 (6)	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—	—
8. Geraffineerde olie uit afvalfen van olijfen	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—	—
9. Olie uit afvalfen van olijfen	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—	—

(1) Maximumgehalte voor totale gehalogeneerde bestanddelen die zijn aangehouden met een elektronenvangstdetector.

Voor individueel aangehouden bestanddelen is het toegestane maximum 0,10 mg/kg.

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

(3) Om na te gaan of geraffineerde olie aanwezig is, moet als K₂₇₀ hoger is dan de voor de betrokken categorie vastgestelde limiet K₂₇₀ worden bepaald over een kolom aluminiumoxide.

(4) Als de mediaan „fruitig” gelijk is aan 0, mag de mediaan van het gebrek niet hoger zijn dan 2,5.

(5) 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 %.

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

▼ M19

Categorie	Zuurgraad					Totaal transli-nolzuur- en trans-linooleen-zuuriso-meren (%)	Choles-terol (%)	Brassi-casterol (%)	Campes-terol (%)	Stigmas-terol (%)	Betasito-sterol (%) (1)	Delta-7-Stigmas-terol (%)	Totaal sterolen (mg/kg)	Erythro-diol plus uvaol (%) (**)
	Myristi-nezuur (%)	Linoleen-zuur (%)	Arachide-zuur (%)	Eicosaan-zuur (%)	Beheenzuur (%)									
1. Extra olijfolie verkregen bij de eerste persing	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Olijfolie verkregen bij de eerste persing	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Courante olijfolie verkregen bij de eerste persing	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
4. Olijfolie verkregen bij de eerste persing, voor verlichting	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (2)
5. Geraffineerde olijfolie	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Olijfolie	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
7. Ruwe olie uit afvallen van olijven	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (3)
8. Geraffineerde olie uit afvallen van olijven	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
9. olie uit afvallen van olijven	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

(1) Totaal van Delta-5,23 stigmastadiënol + chloosterol + betasitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-sigmastadiënol.

(2) 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 van erytrodiol en uvaol niet meer bedraagt dan 3,5 %.

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

Opmerkingen

a) De resultaten van de analyses moeten worden opgegeven met hetzelfde aantal decimale cijfers als in de normen voor elk kenmerk.

b) De laatste significante decimaal wordt naar boven afgerond als de volgende decimaal hoger is dan 4.

c) Om olie in een andere categorie in te delen of qua zuiverheid onvoldoende te verklaren, volstaat het dat een van de kenmerken niet aan de vastgestelde normen beantwoordt.

d) Aangezien de kenmerken met een asterisk (*) betrekking hebben op de kwaliteit van de olie, heeft dit als consequentie dat:

— voor bij de eerste persing verkregen olijfolie voor verlichting niet gelijkijdig aan alle normen (afgezien van K_{232}) hoeft te worden voldaan;

— andere bij de eerste persing verkregen olijfolie die niet aan één van deze normen voldoet, wel wordt ingedeeld in een andere categorie, maar binnen de categorieën olijfolie verkregen bij de eerste persing blijft.

e) De kenmerken met een dubbele asterisk (**) houden in dat voor alle betrokken olie uit afvallen van olijven niet gelijkijdig aan alle normen hoeft te worden voldaan.

▼ **M17***BIJLAGE I bis***Bemonstering van partijen olijfolie en olie uit afval­len van olijven in onmid­dellijke verpakkingen van ten hoogste 100 liter**

Onderstaande bemonsteringsmethode is van toepassing op partijen olijfolie van maximaal 125 000 liter, in onmiddellijke verpakkingen van maximaal 100 liter.

Wanneer de betrokken partij groter is dan 125 000 liter, wordt deze verdeeld in bij benadering gelijke deelpartijen van minder dan 125 000 liter. De methode moet vervolgens worden toegepast op iedere aldus verkregen deelpartij.

1. Inhoud van een primair monster

Elk primair monster bestaat:

- a) voor onmiddellijke verpakkingen met een inhoud van 6 liter of meer, uit de olie van één onmiddellijke verpakking verdeeld over ten minste 6 recipiënten van 1 liter waarvan:
 - 1 recipiënt voor de in de bijlagen II, III, IX en XII bedoelde analyses,
 - 1 recipiënt voor de overige analyses en
 - de resterende recipiënten voor eventuele tegenexpertises.
- b) voor onmiddellijke verpakkingen met een inhoud van 2 liter of meer, maar minder dan 6 liter, uit de olie van 4 onmiddellijke verpakkingen, waarvan:
 - 1 onmiddellijke verpakking voor de in de bijlagen II, III, IX en XII bedoelde analyses,
 - een derde van een andere verpakking voor de overige analyses en
 - de resterende olie voor eventuele tegenexpertises.
- c) voor onmiddellijke verpakkingen met een inhoud van 0,75 liter of meer, maar minder dan 2 liter, de olie van 6 onmiddellijke verpakkingen, waarvan:
 - 1 onmiddellijke verpakking voor de in de bijlagen II, III, IX en XII bedoelde analyses,
 - een andere verpakking voor de overige analyses en
 - de resterende olie voor eventuele tegenexpertises.
- d) voor onmiddellijke verpakkingen met een inhoud van minder dan 0,75 liter, uit de olie van het kleinste aantal verpakkingen dat in totaal meer dan 4,5 liter bevat, verdeeld als volgt:
 - de olie uit het kleinste aantal verpakkingen dat samen meer dan 0,75 liter bevat, is bestemd voor de in de bijlagen II, III, IX en XII bedoelde analyses,
 - dezelfde hoeveelheid is bestemd voor de andere analyses en
 - de rest wordt bewaard voor eventuele tegenexpertises.

2. Aantal primaire monsters

Het minimumaantal primaire monsters dat moet worden genomen, is afhankelijk van de grootte van de partij en wordt bepaald volgens onderstaande tabel.

Partijen kleiner dan (liter)	Minimumaantal primaire monsters
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125 000	5

De onmiddellijke verpakkingen van een primair monster moeten in de partij naast elkaar liggen.

In geval van twijfel verhoogt de lidstaat het aantal te nemen primaire monsters.

3. Analyses en resultaten

De olie moet tot op het tijdstip van de analyse zoveel mogelijk in het oorspronkelijke recipiënt worden bewaard.

▼M17

- a) Ieder primair monster wordt, overeenkomstig punt 2.5 van norm EN ISO 5555, verdeeld in laboratoriummonsters, waarop de volgende analyses worden uitgevoerd:
- bepaling van het gehalte aan vrije vetzuren, als bedoeld in artikel 2, lid 1, eerste streepje;
 - bepaling van het peroxidegetal, als bedoeld in artikel 2, lid 1, tweede streepje;
 - spectrofotometrische analyse, als bedoeld in artikel 2, lid 1, achtste streepje;
 - bepaling van de vetzuursamenstelling, als bedoeld in artikel 2, lid 1, negende streepje.

- b) Indien de resultaten van de onder a) bedoelde analyses voor ten minste één van de primaire monsters uit eenzelfde partij niet allemaal overeenstemmen met de kenmerken van de aangegeven categorie olijfolie, wordt de betrokken partij in haar geheel als niet in overeenstemming met de voorschriften beschouwd.

Indien alle resultaten van de onder a) bedoelde analyses voor elk van de primaire monsters uit eenzelfde partij gelet op de herhaalbaarheid van de betrokken methoden homogeen zijn en overeenstemmen met de kenmerken van de aangegeven categorie olijfolie, wordt één van de primaire monsters uit die partij onderworpen aan de overige analyses.

- c) Indien één van de resultaten van de onder b), tweede alinea, bedoelde analyses niet overeenstemt met de kenmerken van de aangegeven categorie olijfolie, wordt de betrokken partij in haar geheel als niet in overeenstemming met de voorschriften beschouwd.

Indien alle resultaten van de onder b), tweede alinea, bedoelde analyses overeenstemmen met de kenmerken van de aangegeven categorie olijfolie, wordt de betrokken partij in haar geheel als in overeenstemming met de voorschriften erkend.



BIJLAGE II

BEPALING VAN DE ZUURGRAAD

1. DOEL

Bepaling van de vrije vetzuren in olijfolie. Het gehalte aan vrije vetzuren wordt uitgedrukt in de volgens de klassieke methode berekende zuurgraad.

1.1. Principe van de methode

Oplossing van het monster in een mengsel van oplosmiddelen, daarna titrering van de aanwezige vrije vetzuren met behulp van een oplossing van kaliumhydroxide in ethanol.

1.2. Reagentia

Alle reagentia moeten p.a. zijn en het gebruikte water dient gedistilleerd water of water van gelijkwaardige zuiverheid te zijn.

1.2.1. Diëthylether: 95 % ethanol (v/v), mengsel 1: 1 (v/v) in volume.

Waarschuwing: Diëthylether is zeer ontvlambaar en kan explosieve peroxiden vormen. Bij gebruik ervan dienen bijzondere voorzorgen te worden genomen.

Neutraliseer, precies op het ogenblik van gebruik, met de kaliumhydroxide-oplossing (1.2.2), in aanwezigheid van 0,3 ml phenolphtaleïne-oplossing (1.2.3) voor 100 ml mengsel.

Opmerking: Indien gebruik van diëthylether onmogelijk is, kan een mengsel van uit ethanol en toluen bestaande oplosmiddelen worden gebruikt. Zonodig kan ethanol worden vervangen door propanol-2.

1.2.2. Kaliumhydroxide, in ethanol getitreerde oplossing, c(KOH), ongeveer 0,1 mol/l of, indien nodig, c(KOH) ongeveer 0,5 mol/l.

De precieze concentratie van de oplossing van kaliumhydroxide in ethanol dient bekend te zijn en onmiddellijk voor gebruik te worden geverifieerd. Gebruik een oplossing die minstens vijf dagen voor gebruik is bereid en is gedecanteerd in een donkerbruine, met een rubberen stop gesloten fles. De oplossing dient kleurloos of strogeel te zijn.

Opmerking: Een stabiele, kleurloze kaliumhydroxideoplossing kan op de volgende wijze worden bereid. 1 000 ml ethanol op temperatuur en gedurende één uur koken, met reflux, met 8 g kaliumhydroxide en 0,5 g aluminiumsnippers. Onmiddellijk distilleren. In het distillaat de benodigde hoeveelheid kaliumhydroxide oplossen. Verschillende dagen laten rusten en de heldere supernotans van het kaliumcarbonaatneerslag decanteren.

De oplossing kan ook zonder distillatie op de volgende wijze worden bereid. Aan 1 000 ml ethanol 4 ml aluminiumbutylaat toevoegen en het mengsel enkele dagen laten staan. Het supernotans decanteren en de benodigde hoeveelheid kaliumhydroxide erin oplossen. De oplossing is klaar voor gebruik.

1.2.3. Phenolphtaleïne, oplossing van 10 g/l in 95-96 % ethanol (v/v) of alkalisch blauw (in geval van sterk gekleurde vetten), oplossing van 20 g/l in 95-96 % ethanol (v/v).

1.3. Apparatuur

Gebruikelijk laboratoriummateriaal, en met name:

1.3.1. Analytische balans.

1.3.2. Kolf van 250 ml.

1.3.3. Buret van 10 ml, met een schaalindeling van 0,05 ml.

1.4. Werkwijze

1.4.1. Bereiding van het te analyseren monster

De bepaling wordt uitgevoerd op een gefiltreerd monster.

▼B

Wanneer de som van vochtgehalte en gehalte aan onzuiverheden kleiner is dan 1 %, wordt de bepaling uitgevoerd op het monster als zodanig.

1.4.2. Monsterneming

Houd bij het nemen van het monster rekening met het verwachte zuurgetal volgens de gegevens van de volgende tabel.

Verwacht zuurgetal	Hoeveelheid af te wegen monster (g)	Nauwkeurigheid van de weging van het monster (g)
< 1	20	0,05
1 tot 4	10	0,02
4 tot 15	2,5	0,01
15 tot 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Weeg het monster in de kolf (1.3.2).

1.4.3 Bepaling

Los het monster (1.4.2) op in 50 tot 150 ml van het mengsel diëthylether/ethanol (1.2.1) dat tevoren is geneutraliseerd.

Titreer, al schuddend, met de oplossing 0,1 mol/l kaliumhydroxide (1.2.2) (zie opmerking 3) tot omslag van de indicator (rose kleuring van de phenophthaleïne die ten minste 10 seconden aanhoudt).

Opmerking 1: De getitreerde kaliumhydroxideoplossing in ethanol (1.2.2) kan worden vervangen door een oplossing in water van kalium- of natriumhydroxide wanneer het erin gebrachte volume water niet tot een fasescheiding leidt.

Opmerking 2: Als de nodige hoeveelheid 0,1 mol/l kaliumhydroxideoplossing 10 ml overschrijdt, gebruik dan een oplossing van 0,5 mol/l.

Opmerking 3: Als de oplossing troebel wordt tijdens de titrerings, voeg dan een hoeveelheid van het mengsel van oplosmiddelen (1.2.1) toe tot de oplossing helder wordt.

1.5 **Formulering in zuurgraad in percentage oliezuur**

De zuurgraad, uitgedrukt in gewichtspercentage, is gelijk aan:

$$V \cdot c \cdot \frac{M}{1000} \cdot \frac{100}{m} = \frac{V \cdot c \cdot M}{10 \cdot m}$$

waarin:

V = het volume in ml van de gebruikte, getitreerde kaliumhydroxideoplossing;

c = de precieze concentratie, in mol/l van de gebruikte, getitreerde kaliumhydroxideoplossing;

M = het molaire gewicht, in grammen per mol, van het zuur dat voor de weergave van de resultaten is gekozen (= 282);

m = de hoeveelheid af te wegen monster in gram.

Neem als resultaat het rekenkundig gemiddelde ► **M16** van twee bepalingen ◀.



BIJLAGE III

BEPALING VAN HET PEROXIDEGETAL

1. DOEL

Deze norm beschrijft een methode voor de bepaling van het peroxidegetal van oliën en vetten.

2. TOEPASSINGSGEBIED

Deze norm geldt voor dierlijke en plantaardige oliën en vetten.

3. DEFINITIE

Het peroxidegetal is de hoeveelheid stoffen in het monster, uitgedrukt in milli-equivalenten actieve zuurstof per kilogram, die kaliumjodide oxideren bij de beschreven werkomstandigheden.

4. PRINCIPE VAN DE METHODE

Het in een mengsel van azijnzuur en chloroform opgeloste vet wordt behandeld met kaliumjodide en het vrijgemaakte jodide wordt getitreerd met natriumthiosulfaatoplossing.

5. APPARATUUR

Alle gebruikte apparatuur dient vrij te zijn van reducerende of oxiderende stoffen.

Opmerking: Geslepen oppervlakten niet invetten.

5.1. 3 ml glazen weegschuitje.

5.2. Kolven met geslepen halzen en stoppen, van ongeveer 250 ml, vooraf gedroogd en gevuld met een zuiver, droog inert gas (stikstof of, bij voorkeur, koolstofdioxide).

5.3. Buret van 25 of 50 ml, met een schaalindeling van 0,1 ml.

6. REAGENTIA

6.1. Chloroform, p.a., zuurstofvrij gemaakt door lichtjes te laten doorborrelen met een stroom zuiver, droog inert gas.

6.2. Ijsazijn, p.a., zuurstofvrij gemaakt door lichtjes te laten doorborrelen met een stroom zuiver, droog gas.

6.3. Kaliumjodide, verzadigde oplossing in water, vlak vóór gebruik bereid, vrij van jodium of jodaat.

6.4. Natriumthiosulfaat, 0,01 of 0,002 N nauwkeurig gestelde oplossing in water, onmiddellijk vóór gebruik gesteld.

6.5. Zetmeeloplossing, 10 g/l oplossing in water, vers bereid uit natuurlijk oplosbaar zetmeel.

7. MONSTER

Zorg ervoor dat het monster niet in de nabijheid van licht wordt genomen, dat het in het donker wordt bewaard en vervolgens koud wordt opgeslagen in volledig gevulde glazen recipiënten, hermetisch afgesloten met stoppen van geslepen glas of kurk.

8. WERKWIJZE

De proef dient in diffuus daglicht of bij kunstlicht te worden uitgevoerd. Weeg in een glazen weegschuitje (5.1), of bij gebrek daaraan in een kolf (5.2), tot op 0,001 g nauwkeurig, een hoeveelheid van het monster volgens de volgende tabel, afhankelijk van het verwachte peroxidegetal.

▼B

Verwacht peroxidegetal (meq O ₂ /kg)	Hoeveelheid van het monster (g)
0 tot 12	5,0 tot 2,0
12 tot 20	2,0 tot 1,2
20 tot 30	1,2 tot 0,8
30 tot 50	0,8 tot 0,5
50 tot 90	0,5 tot 0,3

Ontstop een kolf (5.2) en breng er het glazen weegschuitje in dat het monster bevat. Voeg 10 ml chloroform toe (6.1). Los het monster snel op door roeren. Voeg 15 ml azijnzuur (6.2) toe, daarna 1 ml kaliumjodideoplossing (6.3). Sluit snel af met de stop, schud gedurende één minuut en laat precies vijf minuten in het donker staan bij een temperatuur van 15 tot 25 °C.

Voeg ongeveer 75 ml gedistilleerd water toe. Titreer, krachtig schuddend, het vrijgekomen jodium met de natriumthiosulfaatoplossing (6.4) (0,002 N oplossing voor verwachte waarden van minder dan 12 en 0,01 N oplossing voor verwachte waarden boven 12), met gebruik van de zetmeeloplossing (6.5) als indicator.

Voer twee bepalingen uit op hetzelfde proefmonster.

Voer terzelfder tijd een blanco bepaling uit. Indien het resultaat van de blanco bepaling meer bedraagt dan 0,05 ml van de 0,01 N natriumthiosulfaatoplossing (6.4), vervang dan de onzuivere reagentia.

9. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Het peroxidegetal, uitgedrukt in milli-equivalenten actieve zuurstof per kilogram, wordt weergegeven met de formule:

$$P.V. = \frac{V \cdot T \cdot 1\,000}{m}$$

waarin:

V = de gebruikte hoeveelheid gestelde natriumthiosulfaatoplossing (6.4) in millimeter, gecorrigeerd om rekening te houden met de blanco bepaling;

T = de precieze normaliteit van de gebruikte natriumthiosulfaatoplossing (6.4);

m = het gewicht van het monster, in gram.

Neem als resultaat het rekenkundig gemiddelde van de twee uitgevoerde bepalingen.

▼ **M6***BIJLAGE IV***BEPALING VAN HET GEHALTE AAN WAS MET BEHULP VAN
CAPILLAIRE GASCHROMATOGRAFIE**

1. DOEL

Deze methode beschrijft een werkwijze voor de bepaling van het gehalte aan was van enkele oliën en vetten onder de beschreven omstandigheden.

De methode kan vooral worden toegepast om geperste olijfolie te onderscheiden van geëxtraheerde olijfolie (uit persafval van olijven).

2. PRINCIPE VAN DE METHODE

De olie of het vet, waaraan een geschikte interne standaard is toegevoegd, wordt gefractioneerd met behulp van een gehydrateerde kiezelgel-kolom. De met deze methode eerst geëluëerde fractie (met een lagere polariteit dan de triglyceriden) wordt opgevangen en vervolgens direct geanalyseerd met capillaire gaschromatografie.

3. APPARATUUR

3.1. Erlenmeyer van 25 ml.

3.2. Glazen chromatografiekolom met een interne diameter van 15,0 mm en een lengte van 30-40 cm.

3.3. Geschikte gaschromatograaf met een capillaire kolom, voorzien van een on-column injectiesysteem bestaande uit:

3.3.1. Een gethermostateerde oven waarmee de kolommen op de gewenste temperatuur kunnen worden gehouden met een nauwkeurigheid van ± 1 °C.

3.3.2. Een injector voor koude directe on-column injectie.

3.3.3. Een vlamionisatiedetector en een versterker/verzwakkereenheid.

3.3.4. Een integrerende recorder, geschikt voor gebruik met de versterker/verzwakkereenheid (3.3.3) met een responstijd van niet meer dan één seconde en met een variabele papersnelheid.

3.3.5. Een glazen of fused-silica capillaire kolom met een lengte van 10-15 m, inwendige diameter 0,25-0,32 mm, inwendig gecoat met SE-52 of SE-54 vloeistof of equivalent in een uniforme dikte tussen 0,10 en 0,30 μm .3.4. Een on-column 10 μl injectiespuit met geharde naald.

4. REAGENTIA

4.1. Kieselgel 70/230 mesh, Merck artikel 7754.

Zet de kiezelgel in een moffeloven gedurende 4 uur bij 500 °C. Laat afkoelen en voeg 2 % water toe. Schud krachtig om de massa te homogeniseren. Bewaar in het donker gedurende tenminste 12 uur alvorens dit te gebruiken.

4.2. n-Hexaan, voor chromatografische doeleinden.

4.3. Ethylether, voor chromatografische doeleinden.

4.4. n-Heptaan, voor chromatografische doeleinden.

4.5. Standaardoplossing van lauryl-arachidaat, 0,1 % (m/v) oplossing in hexaan (interne standaard).

4.6. Draaggas: waterstof, gaschromatografisch zuiver.

4.7. Hulpstoffen:

— waterstof, gaschromatografisch zuiver;

— lucht, gaschromatografisch zuiver.

▼ **M6**

5. WERKWIJZE

5.1. Scheiding van de wasfractie.

5.1.1. Bereiding van de chromatografiekolom.

Suspendeer 15 g 2 % gehydrateerde kiezelgel in n-hexaan watervrij en breng dit in de kolom.

Laat uitzakken en vibreer de kolom met een elektrische vibrator om het chromatografiebed meer homogeen te maken. Leid 30 ml n-hexaan door om onzuiverheden te verwijderen.

5.1.2. Werkwijze met de chromatografiekolom.

Weeg nauwkeurig ongeveer 500 mg monster af in de erlenmeyer van 25 ml, voeg een hoeveelheid interne standaard toe die overeenkomt met het verwachte gehalte aan was. Bijvoorbeeld: voeg 0,1 mg laurylarachidaat toe indien het gaat om olijfolie en 0,25-0,50 mg indien het gaat om geëxtraheerde olijfolie.

Breng het aldus bereide monster over in de volgens 5.1.1 behandelde chromatografiekolom, voeg dan achter elkaar 2 porties van elk 2 ml n-hexaan toe.

Laat dit door de kolom lopen tot boven de absorbers een laag vloeistof van 1 mm resteert. Voer dan de chromatografische elutie uit met 140 ml van een mengsel van n-hexaan/ethylether, 99:1, met een elutiesnelheid van ongeveer 15 druppels per 10 seconden (2,1 ml/minuut).

Damp de aldus verkregen fractie in een rotatievacuümverdampster in tot bijna droog, verwijder de laatste 2 of 3 ml met een zachte stikstofstroom en neem het residu op in 10 ml n-heptaan.

5.2. Gaschromatografische analyse

5.2.1. Voorbereidende werkzaamheden, conditionering van de kolom.

5.2.1.1. Bevestig de kolom in de gaschromatograaf, waarbij het inlaatstuk wordt aangesloten aan het on-column systeem en het uiteinde aan de detector.

Voer de gebruikelijke controle uit van het gaschromatografisch systeem (lekken in de gasvoorziening, efficiëntie van de detector en de recorder).

5.2.1.2. Indien de kolom voor de eerste keer wordt gebruikt, dient hij geconditioneerd te worden. 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). Houd deze temperatuur aan gedurende tenminste 2 uur, stel vervolgens de hele apparatuur in gebruik (regeling van de gassnelheid, ontsteking van de vlam, aansluiting van de elektronische recorder, temperatuurregeling van de kolomruimte en de detector, enz.) en registreer het signaal met een gevoeligheid die tenminste 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 uitgevoerde conditionering van de kolom.

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

5.2.2. Keuze van de werkomstandigheden.

5.2.2.1. Als richtlijn voor de werkomstandigheden kunnen de volgende voorwaarden dienen:

- kolomtemperatuur: start op 80 °C, opwarmen met 30 °C/minuut tot 120 °C, daarna met 5 °C/minuut tot 340 °C;
- detectortemperatuur: 350 °C;
- lineaire snelheid van het draaggas: waterstof 20-35 cm/s;
- gevoeligheid: 4 tot 16 keer de minimumverzwakking;
- gevoeligheid van de recorder: 1-2 mV volle schaaluitslag;
- papersnelheid: 30 cm/uur;
- injectiehoeveelheid: 0,5-1 µl oplossing.

▼ **M6**

Deze voorwaarden kunnen afhankelijk van de karakteristieken van de kolom en van de gaschromatograaf worden gewijzigd zodanig dat chromatogrammen worden verkregen die aan de volgende eisen voldoen:

- de retentietijd van de C32 interne standaard moet ongeveer 25 ± 2 minuten zijn;
- de meest representatieve piek van de was moet tussen 60 en 100 % van de volle schaaluitslag zijn.

5.2.2.2. De piekintegratieparameters moeten zodanig worden gekozen dat een juiste waarde van de piekoppervlakten wordt verkregen.

5.2.3. Uitvoering van de analyse

5.2.3.1. Zuig met de 10 µl injectiespuit 1 µl oplossing op. Trek de plunjer van de spuit zover uit dat de naald leeg is. Penetreer met de naald het membraan van de injectie-eenheid en injecteer snel na 1-2 seconden, verwijder daarna voorzichtig na ongeveer 5 seconden de naald.

5.2.3.2. Neem het chromatogram op tot al de pieken van de was volledig zijn geëluëerd.

De basislijn moet steeds aan de vereiste voorwaarden voldoen (5.2.1.2).

5.2.4. Identificatie van de pieken

Identificeer de verschillende pieken op basis van de retentietijden en door vergelijking met wasmengsels met een bekende retentietijd, die onder dezelfde omstandigheden zijn geanalyseerd.

In figuur 1 wordt een chromatogram getoond van wassen in een koud geperste olijfolie.

5.2.5. Kwantitatieve evaluatie

5.2.5.1. Bereken met de integrator de piekoppervlakten van de interne standaard en de C40-C46 alifatische esters.

5.2.5.2. Bereken de wasconcentratie van elke individuele ester in mg/kg vethoudend materiaal als volgt:

$$\text{ester (mg/kg)} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot \blacktriangleright \mathbf{M9} \ 1\ 000 \ \blacktriangleleft}{A_s \cdot m}$$

waarin:

A_x = piekoppervlak van de ester;

A_s = piekoppervlak van lauryl-arachidaat;

m_s = massa van het toegevoegde lauryl-arachidaat, in milligram;

m = massa van het onderzochte monster, in gram.

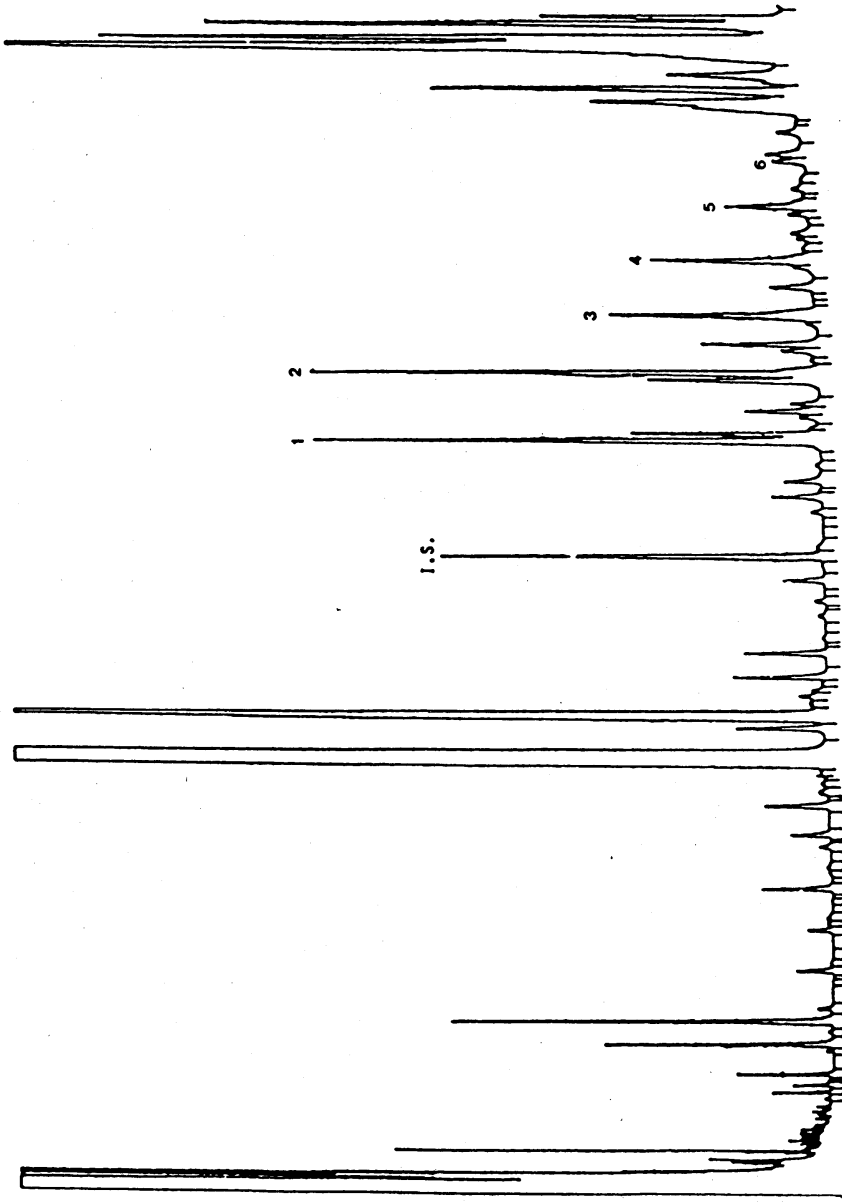
6. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Geef de gehalten van de verschillende wassen en tevens het totaal op in mg/kg vethoudend materiaal.

▼ M6*AANHANGSEL**Bepaling van de lineaire snelheid van het draaggas*

Injecteer 1-3 μl methaan (of propaan) in de onder normale omstandigheden werkende gaschromatograaf en meet de tijd die deze stof nodig heeft om door de kolom te gaan vanaf het moment van injectie tot het verschijnen van de piek (t_m).

De lineaire snelheid van het draaggas in cm/s wordt gegeven door L/t_m , waarbij L de lengte van de kolom in centimeters en t_m de gemeten tijd in seconden is.



FIGUUR 1: Gaschromatogram van de wasfractie in een olijfolie van eerste persing

I.S. = Interne Standard Ester C32

1 = Esters C36

2 = Esters C38

3 = Esters C40

4 = Esters C42

5 = Esters C44

6 = Esters C46

▼B

BIJLAGE V

BEPALING VAN DE STEROLSAMENSTELLING EN HET STEROLGEHALTE MET BEHULP VAN CAPILLAIRE GASCHROMATOGRAFIE

1. DOEL

Deze methode beschrijft een werkwijze voor de bepaling van het individuele en totale sterolgehalte van vetstoffen.

2. PRINCIPE VAN DE METHODE

De vetstof, waaraan α -cholestanol als interne standaard is toegevoegd, wordt verzeept met ethanolische kaliumhydroxideoplossing, waarna het onverzeepbare residu wordt geëxtraheerd met ethylether.

De sterolfraction wordt van het onverzeepbare extract gescheiden met behulp van basische kiezelgel dunne-laagchromatografie. De van de dunne-laagplaat verzamelde sterolen worden omgezet in trimethylsilyl ethers en via capillaire gaschromatografie kwantitatief bepaald.

3. APPARATUUR

- 3.1. Kolf van 250 ml, voorzien van een refluxkoeler met slijpstukken.
- 3.2. Scheitrechters van 500 ml.
- 3.3. Kolven van 250 ml.
- 3.4. Volledige uitrusting voor dunne-laagchromatografie met 20×20 cm glasplaten.
- 3.5. Ultravioletlamp met een golflengte van 366 of 254 nm.
- 3.6. Injectiespuiten van 100 μ l en 500 μ l.
- 3.7. Filterkroes G 3 (poreusiteit 15—40 μ m) met een diameter van ongeveer 2 cm en een hoogte van ongeveer 5 cm, geschikt om onder vacuüm te filteren en voorzien van een slijpstuk 12/21.
- 3.8. Afzuigkolf van 50 ml, voorzien van een slijpstuk 12/21, waarmee deze op de filterkroes kan worden aangesloten.
- 3.9. Konisch afgeronde centrifugebuis van 10 ml, afsluitbaar.
- 3.10. Gaschromatograaf, geschikt voor het werken met een capillaire kolom, voorzien van een splitsysteem bestaande uit:
 - 3.10.1. Een gethermostatiseerde ruimte waarmee de kolommen op de gewenste temperatuur kunnen worden gehouden met een nauwkeurigheid van ± 1 °C.
 - 3.10.2. Een temperatuurgeregelde verdampingseenheid met een gepersilaneerd glazen verdampingselement.
 - 3.10.3. Een vlamionisatiedetector en een versterker-/verzwakkereenheid,
 - 3.10.4. Een integrerende recorder, geschikt voor gebruik met de versterker-/verzwakkereenheid (3.10.3), met een responstijd van niet meer dan één seconde en met een variabele papersnelheid.
- 3.11. Een glazen of fused-silica capillaire kolom met een lengte van 20—30 m, inwendige diameter 0,25—0,32 mm, inwendig gecoat met SE-52- of SE-54-vloeistof of equivalent in een uniforme dikte tussen 0,10 en 0,30 μ m.
- 3.12. Gaschromatografische injectiespuit van 10 μ l met een geharde naald.

4. REAGENTIA

- 4.1. Kaliumhydroxideoplossing, ongeveer 2 M in ethanol. Los 130 g kaliumhydroxide (minimumgehalte 85 %) onder koeling op in 200 ml gedistilleerd water en vul aan tot 1 liter met ethanol. Bewaar de oplossing in goed afgesloten flessen van donker glas.
- 4.2. Ethylether, p.a.
- 4.3. Natriumsulfaat, p.a., watervrij.
- 4.4. Glazen dunne-laagplaten gecoat met kiezelgel zonder fluorescentie-indicator, met een dikte van 0,25 mm (deze zijn gebruiksklaar in de handel te verkrijgen).

▼**B**

- 4.5. Kaliumhydroxideoplossing, 0,2 M in Methanol. Los 13 g kaliumhydroxide op in 20 ml gedistilleerd water en vul met methanol aan tot 1 liter.
- 4.6. Benzeen, voor chromatografische doeleinden.
- 4.7. Aceton, voor chromatografische doeleinden.
- 4.8. Hexaan, voor chromatografische doeleinden.
- 4.9. Ethylether, voor chromatografische doeleinden.
- 4.10. Chloroform, p.a.
- 4.11. Dunnelaagchromatografische referentieoplossing: cholesterol of fyto-sterol, ►**M6** 2 % ◀ oplossing in chloroform.
- 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.
- 4.13. Pyridine, watervrij, voor chromatografische doeleinden.
- 4.14. Hexamethyldisilazaan.
- 4.15. Trimethylchloorsilaan.
- 4.16. Standaardoplossingen van de trimethylsilylethers van de sterolen. Direct vóór gebruik te bereiden uit de zuivere sterolen of uit het mengsel van sterolen verkregen uit de oliën die deze sterolen bevatten.
- 4.17. α -cholestanol, 0,2 % (m/v) oplossing in chloroform (interne standaard).
- 4.18. Draaggas: waterstof of helium, gaschromatografisch zuiver.
- 4.19. Hulpgasen:
 - waterstof, gaschromatografisch zuiver,
 - lucht, gaschromatografisch zuiver.

5. WERKWIJZE

- 5.1. Bereiding van het onverzeepbare residu.
 - 5.1.1. Breng in de kolf van 250 ml met behulp van de injectiespuit van 500 μ l een hoeveelheid 0,2 % α -cholestanoloplossing in chloroform (4.17) die overeenkomt met ongeveer 10 % van de sterolfraction van het te onderzoeken monster. Bij voorbeeld: voeg voor 5 g monster 500 μ l 0,2 % α -cholestanoloplossing toe indien het gaat om olijfolie en 1 500 μ l indien het gaat om ►**M6** ————— ◀ olie uit afval van olijven.

Damp met behulp van een stikstofstroom droog en weeg vervolgens in dezelfde kolf nauwkeurig 5 g van het gedroogde gefiltreerde monster af.

►**M6** Oliën ◀ 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 ►**M6** of moet in plaats van cholestanol betulinol worden gebruikt ◀.
 - 5.1.2. Voeg 50 ml 2 M ethanolische kaliumhydroxideoplossing toe, bevestig de refluxkoeler en verhit tot zachtjes koken op een waterbad onder voortdurend krachtig schudden tot de verzeeping 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.
 - 5.1.3. Breng de inhoud van de kolf kwantitatief over in een 500 ml scheitrichter, waarbij de kolf meerdere keren wordt gespeld met gedistilleerd water tot in totaal ongeveer 50 ml. Voeg ongeveer 80 ml ethylether toe, schud krachtig gedurende ongeveer 30 seconden en laat uitzakken (zie opmerking 1).

Tap de waterige onderlaag af en vang deze op in een tweede scheitrichter. Herhaal de extractie van de waterlaag twee keer op dezelfde manier en gebruik hierbij telkens 60—70 ml ethylether.

Opmerking 1: Eventuele emulsies kunnen worden vernietigd door met een pipet kleine hoeveelheden ethylalcohol of methylalcohol toe te voegen.

- 5.1.4. Verzamel de etherextracten in een scheitrichter en was met telkens 50 ml gedistilleerd water tot het waswater neutraal reageert.

▼B

Verwijder het waswater, droog met watervrij natriumsulfaat en filtreer over watervrij natriumsulfaat in een van tevoren gewogen 250 ml kolf, was de trechter en het filter na met kleine hoeveelheden ethylether.

- 5.1.5. Distilleer de ether tot op enkele ml af, droog door toepassing van een kleine onderdruk of in een stikstofstroom, voltooi het droogproces in een oven bij 100 °C gedurende ongeveer een kwartier, laat afkoelen in een exsiccator en weeg.
- 5.2. Scheiding van de sterolfraction.
- 5.2.1. Bereiding van de basische platen: dompel de kiezelgelplaten (4.4) gedurende 10 seconden volledig in de 0,2 M ethanolische kaliumhydroxideoplossing, laat de platen gedurende 2 uur in een zuurkast drogen en plaats ze ten slotte gedurende 1 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 (de op deze manier bereide platen moeten binnen 2 weken worden gebruikt).

Opmerking 2: Bij gebruik van basische-kiezelgelplaten voor de scheiding van de sterolfraction is de behandeling van het onverzeepbare residu met aluminiumoxide niet nodig. Met deze werkwijze worden alle zure stoffen (vetzuren en andere) vastgehouden op de startlijn en is de sterolband duidelijk gescheiden van de band van de alifatische- en triterpeenalcoholen.

- 5.2.2. Breng in de ontwikkeltank een mengsel van benzeen/acetone, 95: 5 (v/v), tot een hoogte van ongeveer 1 cm. Als alternatief kan een mengsel van hexaan/ethylether, 65: 35 (v/v), worden gebruikt. Sluit de tank af met een geschikt deksel en laat hem gedurende ongeveer een half uur staan zodat een vloeistof/dampevenwicht kan worden bereikt. Stroken filterpapier, 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 elutie-condities te verwezenlijken.

- 5.2.3. Bereid een ongeveer 5 % oplossing van het onverzeepbare residu (5.1.5) in chloroform en breng hiervan met behulp van de 100 µl injectiespuit 0,3 ml aan op 2 cm van de zijkant van de chromatografische plaat (5.2.1) in een vloeiende lijn, die zo dun en uniform mogelijk moet zijn. Breng aan één eind van de plaat op dezelfde hoogte tevens 2—3 µl aan van de sterol-referentieoplossing (4.11) zodat de sterolband na de ontwikkeling kan worden geïdentificeerd.
- 5.2.4. Plaats de plaat in de volgens 5.2.2 voorbehandelde ontwikkeltank. De omgevingstemperatuur dient te liggen tussen 15 °C en 20 °C. 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.
- 5.2.5. Besproei de plaat licht en uniform met de 2,7-dichloorfluoresceïneoplossing. De sterolband kan door bekijken onder ultraviolet licht worden geïdentificeerd aangezien deze op dezelfde hoogte ligt als de vlek van de referentieoplossing. Markeer de grenzen van de band aan de zijkanten van de fluorescentie met een zwart potlood.
- 5.2.6. Schraap met een metalen spatel de kiezelgel in het gemarkeerde gebied af. Breng het afgeschraapte, fijngemaakte materiaal over in de filterkroes (3.7). Voeg 10 ml hete chloroform toe, meng zorgvuldig met de metalen spatel en filtreer onder vacuüm. Verzamel het filtraat in de afzuigkolf (3.8), verbonden aan de filterkroes.

Was het residu in de filterkroes drie maal met ethylether (telkens ongeveer 10 ml), vang het filtraat op in dezelfde kolf. Damp het filtraat in tot een volume van 4—5 ml, breng de resterende oplossing over in de van tevoren gewogen 10 ml centrifugebuis (3.9), damp droog door voorzichtige verwarming in een zachte stikstofstroom, voeg enkele druppels acetone toe, damp weer droog, plaats de buis gedurende ongeveer 10 minuten in een oven bij 105 °C, laat afkoelen in een exsiccator en weeg.

Het in de centrifugebuis aanwezige materiaal is de sterolfraction.

▼B

- 5.3. Bereiding van de trimethylsilylethers.
- 5.3.1. Voeg aan de in de centrifugebuis aanwezige sterolfraction een hoeveelheid silyleringsreagens toe, bestaande uit een mengsel van pyridine/hexamethyldisilazaan/trimethylchlorosilaan 9: 3: 1 (v/v/v) (zie opmerking 4), waarbij voor elke mg sterol 50 µl wordt toegevoegd. Vermijd hierbij bevochtiging (zie opmerking 5).

Opmerking 4: Deze oplossing is kant en klaar in de handel verkrijgbaar. Andere silyleringsreagentia zijn ook bruikbaar, zoals bij voorbeeld bistrimethylsilyltrifluoacetamide + 1 % trimethylchlorosilaan, hetgeen moet worden verdund met een gelijk volume water vrije pyridine.

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

Opmerking 5: De lichte opaalachtige weerschijs die kan worden gevormd, is normaal en veroorzaakt geen storing. 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.

- 5.4. Gaschromatografische analyse.
- 5.4.1. Voorbereidende werkzaamheden, conditionering van de kolom.
- 5.4.1.1. Bevestig de kolom 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 (lekken in de gasvoorziening, detectorefficiëntie, efficiëntie van het splitsysteem en van het recordersysteem, enz.).

- 5.4.1.2. Indien de kolom voor de eerste keer wordt gebruikt, dient hij geconditioneerd te worden. 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 (zie opmerking 6). Houd deze temperatuur aan gedurende ten minste 2 uur, stel vervolgens de hele apparatuur in gebruik (regeling van de gassnelheid en het splitsysteem, ontsteking van de vlam, aansluiting van de elektronische recorder, 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 uitgevoerde conditionering van de kolom.

Opmerking 6: De temperatuur van het conditioneren moet altijd ten minste 20 °C lager zijn dan de maximumtemperatuur die voor de gebruikte stationaire fase is aangegeven.

- 5.4.2. Keuze van de werkomstandigheden.
- 5.4.2.1. Als richtlijn voor de werkomstandigheden kunnen de volgende waarden dienen:

- kolomtemperatuur: 260 °C ± 5 °C;
- injectietemperatuur: 280 °C;
- detectortemperatuur: 290 °C;
- lineaire snelheid van het draaggas: helium 20—35 cm/s, waterstof 30—50 cm/s;
- splitverhouding: van 1: 50 tot 1: 100;
- gevoeligheid: 4 tot 16 keer de minimumverzwakking;
- gevoeligheid van de recorder: 1—2 mV volle schaaluitslag;
- papiersnelheid: 30—60 cm/uur;
- injectiehoeveelheid: 0,5—1 µl TMSE-oplossing.

Deze richtlijnen dienen afhankelijk van de karakteristieken van de kolom en de gaschromatograaf zodanig te worden gekozen dat chromatogrammen worden verkregen die aan de volgende eisen voldoen:

- de retentietijd van β-sitosterol moet ongeveer 20 ± 5 minuten zijn;

▼B

- de campesterolpiek moet de volgende grootte hebben: voor olijfolie (gemiddeld gehalte 3 %) 15 ± 5 % volle schaaluitslag, voor sojaolie (gemiddelde gehalte 20 %) 80 ± 10 % volle schaaluitslag;
- alle aanwezige sterolpieken moeten gescheiden zijn. Daarnaast moeten andere pieken voldoende 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 met behulp van een loodlijn kan worden gekwantificeerd.

5.4.3. Bepaling.

5.4.3.1. Zuig in de 10 µl injectiespuit 1 µl hexaan, 0,5 µl lucht en ten slotte 0,5—1,0 µl monsteroplossing. Trek de plunjer van de spuit zover uit dat de naald leeg is. Penetreer met de naald het membraan van de injectie-eenheid en injecteer snel na 1—2 seconden, verwijder daarna voorzichtig na ongeveer 5 seconden de naald.

5.4.3.2. Neem het chromatogram op tot alle aanwezige TMSE-sterolen volledig zijn geëluëerd.

De basislijn moet blijven voldoen aan de vereiste kwalificaties (5.4.1.2).

5.4.4. Identificatie van de pieken.

Identificeer de individuele pieken op basis van de retentietijden en door een vergelijking met mengsels van TMSE-sterolen die onder dezelfde omstandigheden zijn geanalyseerd.

De sterolen worden geëluëerd in de volgorde: cholesterol, brassicasterol, 24-methyleencholesterol, campesterol, campestanol, stigmasterol, Δ^7 -campesterol, $\Delta^5,23$ -stigmastadienol, clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, Δ^5 -avanesterol, $\Delta^5,24$ -stigmastadienol, Δ^7 -stigmastenol, Δ^7 -avenasterol.

In tabel I worden de relatieve retentietijden ten opzichte van sitosterol opgegeven voor SE 52- en SE 54-kolommen.

In de figuren 1 en 2 worden typische chromatogrammen getoond voor enkele oliën.

5.4.5. Berekening.

5.4.5.1. Bereken met de integrator de oppervlakten van de α -cholestanol en de sterolpieken. Houd geen rekening met pieken van stoffen die niet op de lijst van tabel I voorkomen. De responsfactor van α -cholestanol wordt op 1 gesteld.

5.4.5.2. Bereken de concentratie van elk individueel sterol in mg/100 g vethoudend materiaal als volgt:

$$\text{sterol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m}$$

waarin:

A_x = piekoppervlak van sterol x, in integratoreenheden;

A_s = piekoppervlak van α -cholestanol, in integratoreenheden;

m_s = hoeveelheid van het toegevoegde α -cholestanol, in milligram;

m = hoeveelheid van het onderzochte monster, in gram.

6. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

6.1. Geef de gehalten van de individuele sterolen op in mg/100 g vethoudend materiaal en hun som als „totaal sterolen”.

6.2. 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:

$$\% \text{ van sterol } x = \frac{A_x \cdot 100}{\Sigma A}$$

waarin:

A_x = piekoppervlak van sterol x;

ΣA = som van de piekoppervlakken van alle sterolen.

▼B

AANHANGSEL

Bepaling van de lineaire snelheid van het draaggas

Injecteer 1—3 µl methaan (of propaan) in de onder normale omstandigheden werkende gaschromatograaf en meet de tijd die deze stof nodig heeft om door de kolom te gaan vanaf het moment van injectie tot het verschijnen van de piek (t_M).

De lineaire snelheid van het draaggas in cm/s wordt gegeven door L/t_M , waarbij L de lengte is van de kolom in centimeters en t_M de gemeten tijd in seconden.

Tabel I

Relatieve retentietijden voor de sterolen

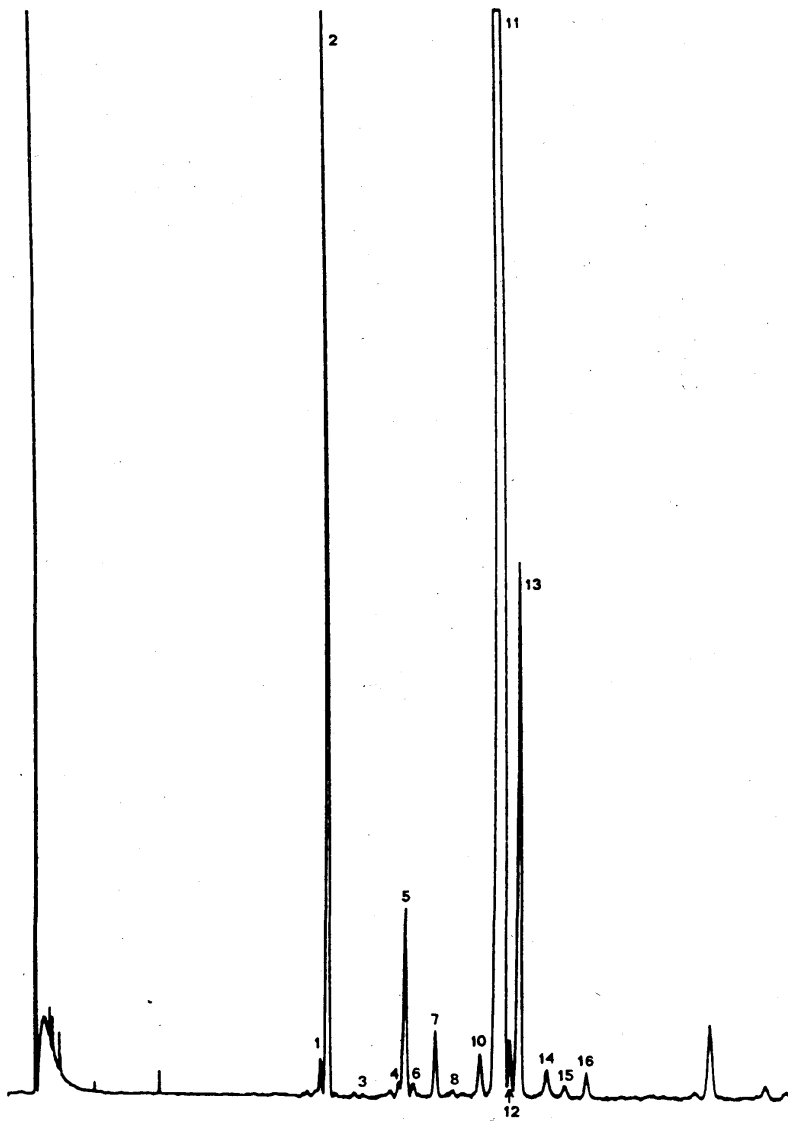
Pi-ek	Identificatie		Relatieve retentietijd	
			SE 54-kolom	SE 52-kolom
1	cholesterol	$\Delta 5$ -cholesteen-3 β -ol	0,67	0,63
2	cholestanol	5 α -cholestaan-3 β -ol	0,68	0,64
3	brassicasterol	[24S]-24-methyl- $\Delta 5,22$ -cholestadien-3 β -ol	0,73	0,71
4	24-methyleen-cholesterol	24-methyleen- $\Delta 5,24$ -cholestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	campesterol	[24R]-24-methyl- $\Delta 5$ -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	$\Delta 7$ -campesterol	[24R]-24-methyl- $\Delta 7$ -cholesteen-3 β -ol	0,93	0,92
9	$\Delta 5,23$ -stigmastadienol	[24R,S]-24-ethyl- $\Delta 5,23$ -cholestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	chlerosterol	[24S]-24-ethyl- $\Delta 5,25$ -cholestadien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -sitosterol	[24R]-24-ethyl- $\Delta 5$ -cholesteen-3 β -ol	1,00	1,00
12	sitostanol	24-ethyl-cholestaan-3 β -ol	1,02	1,02
13	$\Delta 5$ -avenasterol	[24Z]-24-ethylideen-5-cholesteen-3 β -ol	1,03	1,03
14	$\Delta 5,24$ -stigmastadienol	[24S,R]-24-ethyl- $\Delta 5,24$ -cholestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	$\Delta 7$ -stigmastenol	[24R,S]-24-ethyl- $\Delta 7,24$ -cholesteen-3 β -ol	1,12	1,12
16	$\Delta 7$ -avenasterol	[24Z]-24-ethylideen- $\Delta 7$ -cholesteen-3 β -ol	1,16	1,16

De capillaire gaschromatografische bepaling van erythrodiol en uvaol, welke dezelfde sterolanalyse gebruikt, wordt momenteel door de NGD gepubliceerd.

▼B

Figuur 1

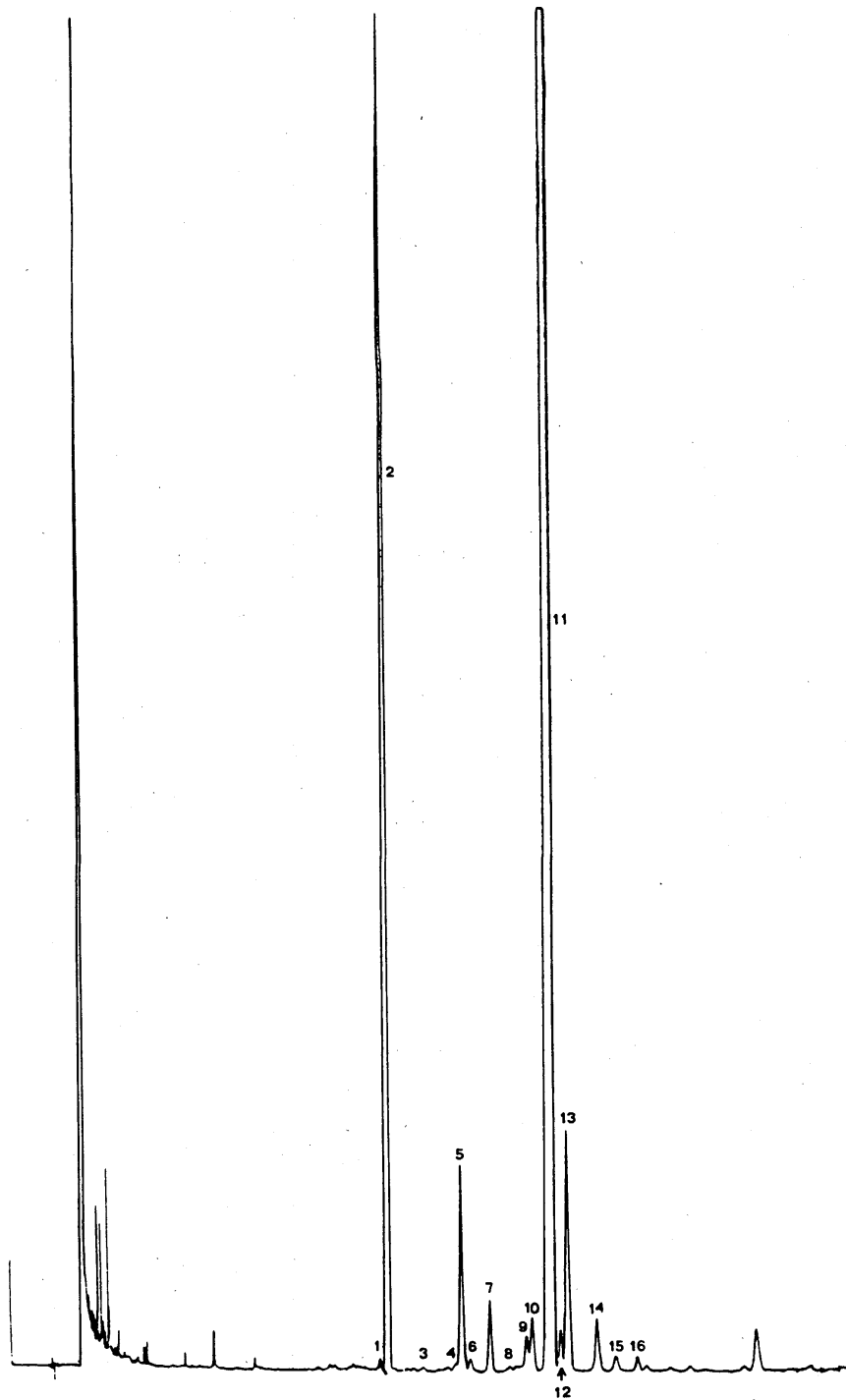
Gaschromatogram van de sterolfractione in een ongeraffineerde olijfolie



▼B

Figuur 2

Gaschromatogram van de sterolfraction in een geraffineerde olijfolie





BIJLAGE VI

BEPALING VAN HET GEHALTE AAN ERYTHRODIOL EN UVAOL

OPMERKING VOORAF

Erythrodiol (onder deze term verstaat men gewoonlijk het geheel van diolen, erythrodiol en uvaol samen) is een bestanddeel van het onverzeepebare residu, en is kenmerkend voor bepaalde vetstoffen. De concentratie ervan is beduidend hoger in olijfolie vervaardigd door extractie dan in de andere soorten olie waarin het voorkomt (koudgeperste olijfolie, druivepittenolie), en daarom kan door bepaling ervan de aanwezigheid van door extractie verkregen olijfolie worden aangetoond.

1. DOEL

De methode beschrijft de werkwijze voor de bepaling van erythrodiol in vetstoffen.

2. PRINCIPE VAN DE METHODE

De vetstof wordt verzeept met een ethanolische kaliumhydroxideoplossing, waarna het onverzeepebare residu wordt geëxtraheerd met diëthylether en wordt gezuiverd door passage over een kolom met aluminiumoxide.

Het onverzeepebare residu wordt gefractioneerd met behulp van kiezelgel dunne-laagchromatografie en de band van de sterolfractioneering en die van de erythrodiolfractioneering worden afgezonderd. De van de dunne-laagplaat verzamelde sterolen en erythrodiol worden omgezet in trimethylsilylethers en het mengsel wordt via gaschromatografie kwantitatief bepaald. Het resultaat wordt uitgedrukt als percentage van erythrodiol in de totale hoeveelheid erythrodiol en sterolen.

3. APPARATUUR

- 3.1. Dezelfde apparatuur als die welke is beschreven in bijlage V (bepaling van de sterolfractioneering).

4. REAGENTIA

- 4.1. Dezelfde reagentia als die welke zijn beschreven in bijlage V (bepaling van de sterolfractioneering).
- 4.2. Referentieoplossing van erythrodiol 0,5 % in chloroform.

5. WERKWIJZE

5.1. **Bereiding van het onverzeepebare residu**

Men gaat te werk zoals beschreven in paragraaf 5.1.2 van bijlage V.

5.2. **Scheiding van de erythrodiol- en de sterolfractioneering.**

- 5.2.1. Zie paragraaf 5.2.1 van methode C-51.

- 5.2.2. Zie paragraaf 5.2.2 van vorengenoemde methode.

- 5.2.3. Bereid een 5 % oplossing van het onverzeepebare residu in chloroform. Breng van deze oplossing met behulp van de 0,1 ml injectiespuit 0,3 ml aan op ongeveer 1,5 cm van de benedenrand van de chromatografische plaat in een vloeiende lijn die zo dun en uniform mogelijk moet zijn. Breng aan één kant van de plaat tevens enkele microliter van de cholesterol- en erythrodioloplossingen aan als referentie.

- 5.2.4. Plaats de plaat in de volgens 5.2.2 voorbehandelde ontwikkeltank. De omgevingstemperatuur dient ongeveer 20 °C te bedragen. 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.

- 5.2.5. Besproei de plaat uniform met de 2,7-dichloorfluoresceïneoplossing. Door bekijken onder ultraviolet licht kunnen de sterolband en de erythrodiolband worden geïdentificeerd aangezien deze op dezelfde hoogte liggen als de referentievlek. Markeer met een punt iets buiten de zijanten van de fluorescentie.

▼B

5.2.6. Schraap met een metalen spatel de kiezelgel in de gemarkeerde gebieden af. Breng het afgeschraapte materiaal in de afzuigkolf van 50 ml; voeg 15 ml hete chloroform toe, schud goed en filter op de filterkroes door de kiezelgel op het filter te leggen. Was het residu driemaal met hete chloroform (telkens ongeveer 10 ml), en vang het filtraat op in een glazen kolf van 100 ml. Damp het filtraat in tot een volume van 4—5 ml, breng de resterende oplossing over in de van tevoren getarreeerde 10 ml konisch afgeronde centrifugebuis, damp droog door voorzichtige verwarming in een stikstofstroom, en weeg.

5.3. **Bereiding van trimethylsilylethers**

Ga te werk zoals is beschreven in punt 5.3 van bijlage V.

5.4. **Gaschromatografische analyse**

Ga te werk zoals beschreven in punt 5.4 van bijlage V. De werkwijze van de gaschromatografische analyse moet zodanig zijn dat niet alleen aan de eisen voor de bepaling van de sterolen wordt voldaan, maar dat ook een scheiding van TMSE van het erythrodiol en van het uvaol wordt verkregen.

Injecteer de monsteroplossing en laat het papier draaien totdat de aanwezige sterolen, erythrodiol en uvaol zijn geëluëerd; identificeer vervolgens de pieken (de retentietijden van erythrodiol en uvaol zijn circa 1,45, respectievelijk 1,55 maal groter dan die van B-sitosterol) en bereken de oppervlakten ervan zoals aangegeven voor de sterolen.

6. **WEERGAVE VAN DE RESULTATEN**

$$\text{Erythrodiol, \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \Sigma A} \cdot 100$$

waarin:

A_1 = piekoppervlak van erythrodiol, in vierkante millimeter;

A_2 = piekoppervlak van uvaol, in vierkante millimeter;

ΣA = som van de piekoppervlakten van de aanwezige sterolen, in vierkante millimeter.

Het resultaat wordt uitgedrukt tot op één cijfer achter de komma.



BIJLAGE VII

**BEPALING VAN VETZUREN OP DE 2-POSITIE IN TRIGLYCERIDEN
VAN OLIËN EN VETTEN**

1. DOEL

Deze norm beschrijft een methode voor de bepaling van de samenstelling van de vetzuurfraction van een olie of vet, veresterd op de 2-positie van glycerol.

2. TOEPASSINGSGBIED

Deze norm geldt voor oliën en vetten met een smeltpunt onder 45 °C ten gevolge van de specifieke kenmerken van de werking van pancreaslipase.

Ze geldt niet onvoorwaardelijk voor oliën en vetten die aanzienlijke hoeveelheden bevatten van: vetzuren met 12 of minder koolstofatomen (kokosnootolie en palmpitolie, botervet) of sterk onverzadigde vetzuren (met meer dan vier dubbele bindingen) die 20 of meer koolstofatomen bevatten (visolie en olie van zeedieren) of vetzuren die andere geoxygeerde groepen dan de zuurgroep bevatten.

3. PRINCIPE

Mogelijke neutralisering van zure oliën en vetten in een oplosmiddel. Zuivering door op een aluminiumoxidekolom te brengen. Gedeeltelijke hydrolyse van triglyceriden met pancreaslipase gedurende een bepaalde tijd. Afscheiding van de gevormde monoglyceriden door dunne-laagchromatografie en methanolysen van deze monoglyceriden. Analyse van deze methylesters door gas/vloeistofchromatografie.

4. APPARATUUR

- 4.1. Rondbodemkolf van 100 ml.
- 4.2. Rondbodemkolf van 25 ml, met geslepen stop.
- 4.3. 1 m lange luchtcondensator voor kolf 4.2.
- 4.4. Kolf van 250 ml.
- 4.5. Bekerglas van 50 ml.
- 4.6. Scheitrechter van 500 ml.
- 4.7. Glazen chromatografiekolom over 13 mm invoerdiameter en 400 mm lang, voorzien van een filter van gesinterd glas en een kraan.
- 4.8. Centrifugebuis van 10 ml, met ingeslepen glazen stop.
- 4.9. Buret van 5 ml met schaalindeling van 0,05 ml.
- 4.10. Hypodermische injectiespuit van 1 ml met dunne naald.
- 4.11. Micro-injectiespuit waaruit druppels van 3—4 µl komen.
- 4.12. Uitstrijkapparaat voor dunne-laagchromatografie.
- 4.13. Glazen platen voor dunne-laagchromatografie, 20 × 20 cm.
- 4.14. Glazen ontwikkeltank voor dunne-laagchromatografie, met een deksel van geslepen glas, geschikt voor platen van 20 × 20 cm.
- 4.15. Spray voor dunne-laagchromatografie.
- 4.16. Oven afgesteld op 103 ± 2 °C.
- 4.17. Thermostaat regelbaar tussen 30 en 45 °C, tot op 0,5 °C nauwkeurig.
- 4.18. Rotatie-vacuümverdamper.
- 4.19. Vibrerend elektrisch schudapparaat, waarmee de centrifugebuis krachtig kan worden geschud.
- 4.20. Ultravioletlamp voor onderzoek van de dunne-laagplaten.

En voor de controle van de lipaseactiviteit:

- 4.21. pH-meter.
- 4.22. Spiraalvormig roerstaafje.

▼B

- 4.23. Buret van 5 ml.
- 4.24. Stopwatch.

En voor de eventuele bereiding van lipase:

- 4.25. Laboratoriumschudapparaat, geschikt voor de dispersie en menging van heterogene materialen.

5. REAGENTIA

- 5.1. n-Hexaan of bij gebreke daarvan petroleumether (kookpunt 30—50 °C), chromatografische kwaliteit.
- 5.2. 2-Propanol of ethanol, 95 % (v/v), p.a.
- 5.3. 2-Propanol of ethanol, 1/l oplossing in water.
- 5.4. Diëthylether, vrij van peroxiden.
- 5.5. Aceton.
- 5.6. Mierezuur, ten minste 98 % (m/m).
- 5.7. Ontwikkelvloeistof: mengsel van n-hexaan (5.1), diëthylether (5.4) en mierezuur (5.6) in verhoudingen 70/30/1 (v/v/v).
- 5.8. Geactiveerd aluminiumoxide voor chromatografische doeleinden, neutraal, kwaliteit Brockmann I.
- 5.9. Siliciumdioxidepoeder met bindmiddel, geschikt voor dunne-laagchromatografie.
- 5.10. Pancreaslipase van geschikte kwaliteit (zie de opmerkingen 1 en 2).
- 5.11. Natriumhydroxide, 120 g/l oplossing in water.
- 5.12. Zoutzuur 6 N oplossing in water.
- 5.13. Calciumchloride (CaCl₂), 220 g/l oplossing in water.
- 5.14. Natriumcholaat, voor enzymatische doeleinden, 1 g/l oplossing in water.
- 5.15. Bufferoplossing: 1 M oplossing in water van trishydroxymethylaminomethaan wordt op pH 8 gebracht door toevoeging van zoutzuur (5.12) (potentiometrisch te controleren).
- 5.16. Phenolphtaleïne, 10 g/l oplossing in 95 % ethanol (v/v).
- 5.17. 2,7-dichloorfluoresceïne, 2 g/l oplossing in 95 % ethanol (v/v), licht alkalisch gemaakt door toevoeging van één druppel 1 N-natriumhydroxideoplossing per 100 ml.

En voor de controle van de lipasewerking:

- 5.18. Geneutraliseerde olie.
- 5.19. Natriumhydroxide, 0,1 N waterige oplossing.
- 5.20. Natriumcholaat voor enzymatische doeleinden, 200 g/l oplossing in water.
- 5.21. Arabische gom, 100 g/l oplossing in water.

6. BEREIDING VAN HET MONSTER

Indien het monster een zuurgraad heeft van minder dan 3 %, bepaald overeenkomstig bijlage II: direct zuiveren over aluminiumoxide overeenkomstig punt 6.2.

Indien het monster een zuurgraad heeft van meer dan 3 %, bepaald overeenkomstig bijlage II: neutraliseren met alkali in aanwezigheid van een oplosmiddel (6.1), dan brengen op aluminiumoxide (6.2).

- 6.1. Neutralisering met alkali in aanwezigheid van een oplosmiddel

Breng in een scheidrecter (4.6) ongeveer 10 g ruwe olie en voeg 100 ml hexaan (5.1) toe, 50 ml 2-propanol (5.2), enkele druppels phenolphtaleïneoplossing (5.16) en een hoeveelheid van de natriumhydroxideoplossing (5.11) die overeenkomt met de vrije zuurgraad van de olie plus 0,3 % overmaat. Schud krachtig gedurende één minuut, voeg 50 ml gedistilleerd water toe, schud opnieuw en laat bezinken.

Laat, na scheiding van de lagen, de onderste laag met de zepen weglopen. Verwijder tevens mogelijke intermediaire lagen (slijmachtige en onopgeloste stoffen). Was de hexaanoplossing van de geneutraliseerdeolie met

▼B

opeenvolgende porties van 25—30 ml van de 2-propanoloplossing (5.3) tot de roze kleur van de phenolphtaleïne verdwijnt. Verwijder het merendeel van het hexaan door destillatie onder vacuüm in de rotatievacuümverdamer (4.18), droog de olie bij 30—40 °C onder vacuüm met behulp van een stroom zuivere stikstof tot de hexaan volledig is verwijderd.

6.2. Zuivering met aluminiumoxide.

Bereid een oplossing van 15 g geactiveerd aluminiumoxide (5.8) in 50 ml hexaan (5.1) en giet het, al roerend, op de chromatografiekolom (4.7). Laat het aluminiumoxide gelijkmatig bezinken en laat het niveau van het oplosmiddel dalen tot 1—2 mm boven de absorbent. Giet zorgvuldig een oplossing van 5 g olie in 25 ml hexaan (5.1) op de kolom, verzamel het volledige effluent van de kolom in een rondbodempkolf (4.1).

7. KLAARMAKEN VAN DE CHROMATOGRAFISCHE PLATEN

Reinig de glazen platen (4.13) grondig met ethanol, petroleumether en aceton ten einde alle vetsporen te verwijderen.

Plaats in een kolf (4.4) 30 g siliciumdioxidepoeder (5.9). Voeg 60 ml gedistilleerd water toe. Plaats de stop erop en schud krachtig gedurende één minuut. Breng de massa onmiddellijk over op het uitstrijkapparaat (4.12) en bedek de zuivere platen met een 0,25 mm dikke laag.

Droog de platen gedurende 15 minuten aan de lucht en daarna gedurende een uur in de oven (4.16) bij 103 ± 2 °C. Koel de platen in een droogstoof tot kamertemperatuur vóór gebruik.

Klaargemaakte platen zijn in de handel beschikbaar.

8. WERKWIJZE

8.1. Hydrolyse met pancreaslipase.

Weeg in de centrifugebuis (4.8) ongeveer 0,1 g van het bereide monster; indien het monster een vloeibare olie is, ga dan direct te werk als hieronder vermeld; indien het een vast vet is dan moet het worden opgelost in 0,2 ml hexaan (5.1) met zonedig voorzichtige verwarming.

Voeg 20 mg lipase (5.10) en 2 ml bufferoplossing (5.15) toe. Schud goed maar zorgvuldig en voeg 0,5 ml natriumcholaatoplossing (5.14) toe en 0,2 ml calciumchlorideoplossing (5.13). Sluit de buis met de geslepen stop, schud voorzichtig (vermijd natmaken van de stop) en plaats de buis onmiddellijk in het thermostaatbad (4.17) dat op $40 \pm 0,5$ °C wordt gehouden en schud met de hand gedurende precies één minuut.

Haal de buis uit het thermostaatbad en schud krachtig door middel van het elektrisch schudapparaat (4.19) gedurende precies twee minuten.

Koel onmiddellijk af onder stromend water; voeg 1 ml zoutzuur (5.12) en 1 ml diëthylether (5.4) toe. Plaats de stop erop en meng krachtig door middel van het elektrisch schudapparaat. Laat staan en verwijder de organische laag met de injectiespuit (4.10), zonedig na centrifugering.

8.2. Scheiding van de monoglyceriden door dunne-laagchromatografie.

Breng het extract met de micro-injectiespuit (4.11) aan op de chromatografische plaat, ongeveer 1,5 cm van de benedenrand in een dunne, uniforme lijn, zo smal mogelijk. Plaats de plaat in de goed verzadigde ontwikkeltank (4.14) en ontwikkel met de ontwikkelvloeistof (5.7) bij ongeveer 20 °C tot ongeveer 1 cm van de bovenrand van de plaat.

Droog de plaat aan de lucht bij de temperatuur van de vloeistoftank en bespreek ze met 2,7-dichloorfluoresceïne-oplossing (5.17). Markeer de plaats (band) van de monoglyceriden (Rf ongeveer 0,035) onder UV-licht (4.20).

8.3. Analyse van de monoglyceriden met gas/vloeistofchromatografie.

Verwijder de onder 8.2 verkregen band met een spatel (vermijd daarbij meenemen van stoffen die op de basislijn zijn achtergebleven) en breng deze over in de methyleringskolf (4.2).

Behandel het verkregen siliciumdioxide direct volgens de in bijlage X.B vermelde methodes ten einde de monoglyceriden om te zetten in methylesters en daarna de esters te onderzoeken met gaschromatografie zoals beschreven in bijlage X.A.

▼B

9. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Bereken de samenstelling van de vetzuren op de 2-positie tot op één cijfer achter de komma (zie opmerking 3).

10. OPMERKINGEN

Opmerking 1: Controle van de activiteit van het lipase

Bereid een olie-emulsie door in een geschikte mixer een mengsel te schudden van 165 ml van een oplossing van arabische gom (5.21), 15 g ijsschilfers en 20 ml geneutraliseerde olie (5.18).

Breng 10 ml van deze emulsie in een bekeerglas (4.5), voeg hieraan 0,3 ml natriumcholaatoplossing (5.20) en 20 ml gedistilleerd water toe.

Plaats het bekeerglas in een waterbad, gethermostatiseerd op $37 \pm 0,5$ °C (zie opmerking 4), en breng de elektroden van een pH-meter (4.21) en een roerstaafje (4.22) in.

Voeg vervolgens door middel van een buret (4.23) druppel voor druppel de natriumhydroxideoplossing (5.19) toe, tot een pH van 8,5 is bereikt.

Voeg een voldoende hoeveelheid van een lipaseoplossing in water (zie hieronder) toe. Zodra de pH-meter een pH van 8,3 aangeeft, de stopwatch starten (4.24) en druppelsgewijs de natriumhydroxideoplossing (5.19) toevoegen met een zodanige snelheid dat de pH op 8,3 blijft. Noteer elke minuut het verbruikte volume alkalioplossing.

Geef in grafiekvorm de verkregen gegevens weer, waarbij op de x-as de tijd wordt aangegeven en op de y-as het volume verbruikte alkalioplossing om de pH constant te houden. Het resultaat dient een rechte lijn te zijn.

De hierboven genoemde lipasesuspensie is een suspensie van 1 per 1 000 (m/m) in water. Voor elke test dient voldoende van deze suspensie te worden gebruikt, zodat ongeveer 1 ml van de alkalioplossing in vier tot vijf minuten wordt verbruikt. Meestal is ongeveer 1—5 mg van het poeder nodig. De lipase-eenheid wordt gedefinieerd als de hoeveelheid enzym die per minuut 10 meq zuur vrijmaakt. Dan wordt de activiteit A van het gebruikte poeder, uitgedrukt in lipase-eenheden per milligram, berekend aan de hand van de formule:

$$A = \frac{V \cdot 10}{m}$$

waarin:

V = het volume natriumhydroxideoplossing (5.19) verbruikt per minuut (berekend uit de grafiek);

m = de hoeveelheid onderzochte lipase, in milligram, van het poedermonster

Opmerking 2: Bereiding van lipase

Lipase met voldoende lipaseactiviteit is in de handel verkrijgbaar, maar kan ook in het laboratorium als volgt worden bereid:

Koel 5 kg verse varkenspancreas af tot 0 °C, verwijder al het omgevende vet en bindweefsel en verklein het restant in een kogelmolen met fijne messen tot een vloeibare pasta is overgebleven. Meng deze pasta met het roerstaafje (4.25) gedurende vier tot zes uur, samen met 2,5 liter watervrij aceton, en centrifugeer. Extraheer het residu nog driemaal met hetzelfde volume aceton, dan tweemaal met een 1/1 (v/v) mengsel van aceton en diëthylether en ten slotte tweemaal met diëthylether.

Droog het residu gedurende 48 uur onder vacuüm; hierdoor wordt een stabiel poeder verkregen dat in een koelkast dient te worden opgeslagen.

Opmerking 3: Het is in ieder geval aan te raden de samenstelling te bepalen van het totaal aan vetzuren van hetzelfde monster,

▼B

aangezien de vergelijking met de samenstelling van de zuren op de 2-positie nuttig is voor interpretatie van de verkregen cijfers.

Opmerking 4: De hydrolysetemperatuur is vastgesteld op 37 °C omdat een vloeibare olie wordt gebruikt. Ze wordt evenwel op 40 °C gebracht voor het monster om het onderzoek van vetten met smeltpunten tot 45 °C mogelijk te maken.



BIJLAGE VIII

BEPALING VAN HET GEHALTE VAN TRILINOLEÏNE

1. DOEL

Deze norm beschrijft een methode voor de scheiding en de kwantitatieve bepaling van de triglyceridensamenstelling van plantaardige oliën, aan de hand van hun molecuulgewicht, en het aantal dubbele bindingen, uitgedrukt in hun equivalent koolstofgetal (zie opmerking 1).

2. TOEPASSINGSGEBIED

Deze norm geldt voor alle plantaardige oliën die triglyceriden bevatten van vetzuren met lange keten. De methode geldt in het bijzonder voor de opsporing van de aanwezigheid van kleine hoeveelheden halfdrogende oliën (rijk aan linolzuur) in plantaardige oliën die als overwegend onverzadigd vetzuur oliezuur bevatten, zoals olijfolie.

3. PRINCIPE

Scheiding van triglyceriden, uitgedrukt in hun equivalent koolstofgetal met hoge-drukvlloeistofchromatografie (omgekeerde vaste polariteit) en interpretatie van de chromatogrammen.

4. APPARATUUR

- 4.1. Hoge-drukvlloeistofchromatograaf waarmee thermostatische controle van de kolomtemperatuur mogelijk is.
- 4.2. Injectie-eenheid met een capaciteit van 10 µl.
- 4.3. Detector: differentiële refractometer. De gevoeligheid bij volledige schaaluitslag dient ten minste 10^{-4} -eenheid te zijn van de brekingsindex.
- 4.4. Kolom: buis van roestvrij staal, 250 mm lang en met een binnendiameter van 4,5 mm, gepakt met siliciumdioxide-deeltjes van 5 µm diameter en met 22—23 % koolstof in de vorm van octadecylsilaan (zie opmerking 2).
- 4.5. Recorder en/of integrator.

5. REAGENTIA

De reagentia dienen p.a. te zijn. Elutievloeistoffen dienen ontgast te zijn en kunnen verschillende malen worden gerecycleerd zonder dat dit invloed heeft op de scheidingen.

- 5.1. Chloroform.
- 5.2. Aceton.
- 5.3. Acetonitril.
- 5.4. Elutievloeistof: acetonitril + aceton (verhoudingen moeten worden aangepast om de gewenste scheiding te verkrijgen; begin met een 50: 50-mengsel).
- 5.5. Oplosmiddel: aceton of 1: 1 acetonchloroformmengsel.
- 5.6. Referentieglyceriden: in de handel verkrijgbare triglyceriden (tripalmpitaat, triolaat, enz.) kunnen worden gebruikt en zo kunnen de retentietijden worden uitgezet tegen het equivalente koolstofgetal, of anders kan een met sojaolie verkregen referentiechromatogram worden opgesteld (zie opmerking 3 en 4 en de figuren 1 en 2).

6. BEREIDING VAN MONSTERS

Een 5 % oplossing van de te analyseren monsters wordt bereid door het afwegen van $0,5 \pm 0,001$ g van het monster in een kolf met een schaalindeling van 10 ml en het bijvullen tot 10 ml met het oplosmiddel (5.5).

7. WERKWIJZE

- 7.1. Installeer het chromatografiesysteem. Pomp de elutievloeistof (5.4) op in een tempo van 1,5 ml/mm ten einde het volledige systeem te zuiveren. Wacht tot een stabiele basislijn wordt verkregen.

Injecteer 10 µl van het volgens punt 6 bereide monster.

▼B

8. BEREKENING EN WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Gebruik de methode met interne standaard, dat wil zeggen ga ervan uit dat de som van de piekoppervlakken voor de verschillende triglyceriden gelijk is aan 100 %. Bereken het relatieve percentage van elk triglyceride aan de hand van de formule:

$$\% \text{ triglyceride} = \frac{\text{piekoppervlak}}{\text{som van de piekoppervlakken}} \times 100$$

waarbij het resultaat met één cijfer achter de komma wordt opgegeven.

Opmerking 1: De elutievolgorde kan worden bepaald door het berekenen van de equivalente koestofgetallen, dikwijls gedefinieerd met de vergelijking $ECN = CN - 2n$, waarin CN het koolstofgetal is en n het aantal dubbele bindingen; zij kan veel preciezer worden berekend door rekening te houden met de oorsprong van de dubbele binding. Indien n_o , n_1 en n_{in} de aantallen dubbele bindingen zijn die respectievelijk worden toegeschreven aan oliezuur, linolzuur en linoleenzuur, kan het equivalent koolstofgetal worden berekend aan de hand van de formule:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_1 n_1 - d_{in} n_{in},$$

waarin de coëfficiënten d_o , d_1 en d_{in} kunnen worden berekend door middel van de referentieglyceriden. Onder de in deze methode gespecificeerde voorwaarden zal de verkregen vergelijking dicht liggen bij:

$$ECN = CN - [2,60 n_o] - [2,35 n_1] - [2,17 n_{in}].$$

Opmerking 2: Voorbeelden: Lichrosorb (Merck) RP 18 Art. 50333,

Lichrosphere (Merck) 100 CH 18 Art. 50377
of een soortgeijk produkt.

Opmerking 3: Met verschillende referentieglyceriden kan ook de resolutie ten opzichte van triolaat worden berekend

$$\alpha = \frac{RT'}{RT'_{oleaat}}$$

door gebruik van de gereduceerde retentietijd $RT' = RT - RT_{oplosmiddel}$

De grafiek van $\log \alpha$ tegen f (aantal dubbele bindingen) maakt het mogelijk de retentiewaarden te bepalen voor alle triglyceriden van vetzuren in de referentietriglyceriden (zie figuur 2).

Opmerking 4: De efficiëntie van de kolom moet zodanig zijn dat de piek van LLL (trilinolaat) afkomstig van de triglyceriden duidelijk gescheiden is van de aangrenzende RT.

▼M11

Opmerking 5: Voor olijfolie voor verlichting verkregen bij de eerste persing en voor ruwe oliën uit afvallen van olijven moet de olie, om een goede scheiding tussen de trilineïnepieken en de pieken daarnaast of de pieken van eventuele interfererende stoffen te verkrijgen, vooraf worden gezuiverd overeenkomstig de volgende methode.

Men absorbeert 200 µl olie, zonder verdunning, op een siliciumdioxide-extractiekolom van het type SEP PAK silica cartridge-waters part. nr. 51900.

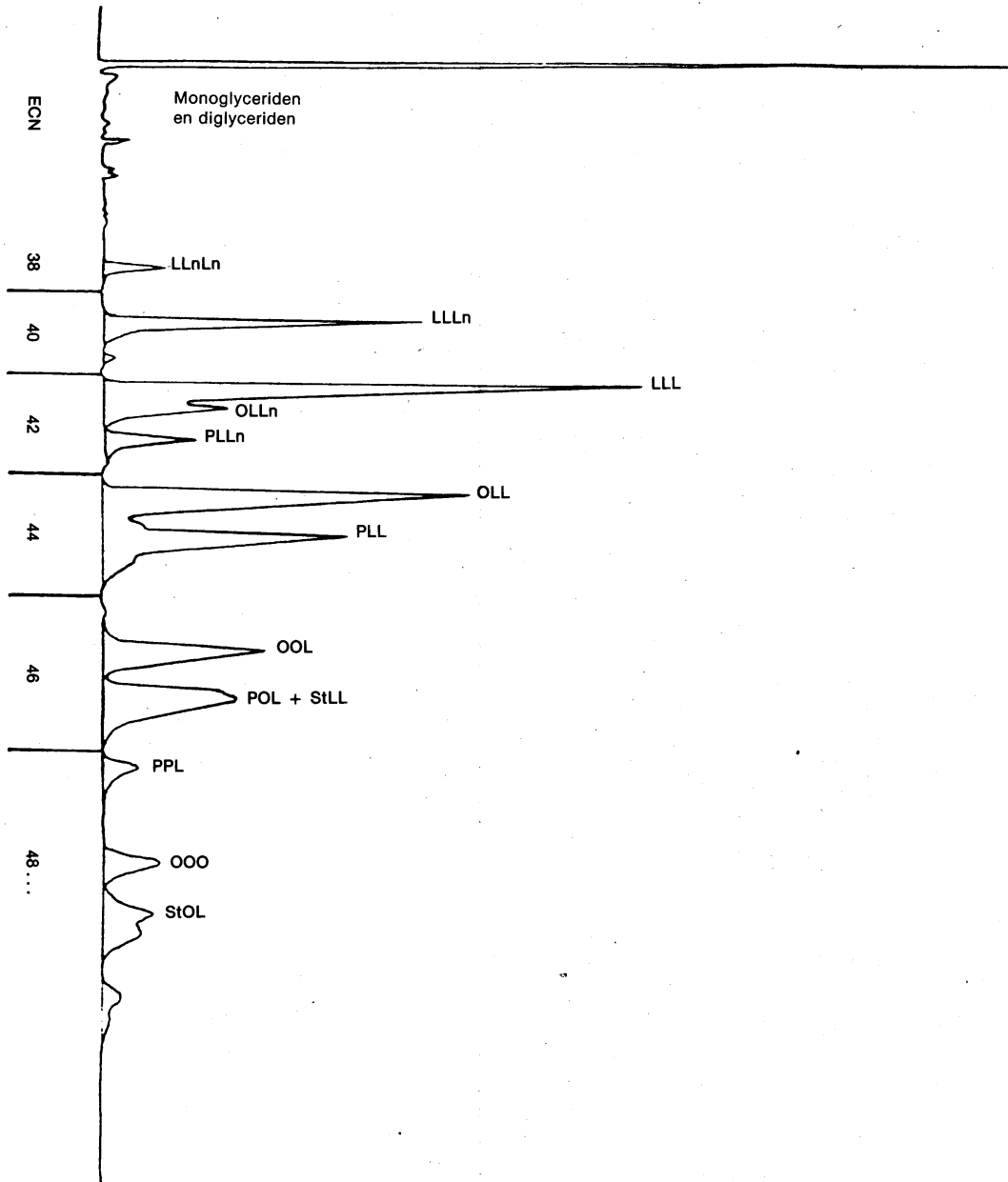
De triglyceriden worden vervolgens in een tijdspanne van ten hoogste 20 sec. geëluëerd met 20 ml watervrij hexaan voor HPLC.

Het eluaat wordt gedroogd met een stikstofstroom en opgenomen in isopropanol of aceton (5 ml). 10-20 µl wordt geïnjecteerd op een HPLC-kolom. Er moet worden geïnfiltreerd of de olie, qua vetzuren, binnen de voor de betrokken analysemethode geldende fouttolerantie, dezelfde samenstelling heeft vóór en na de zuivering.

▼B

Figuur 1

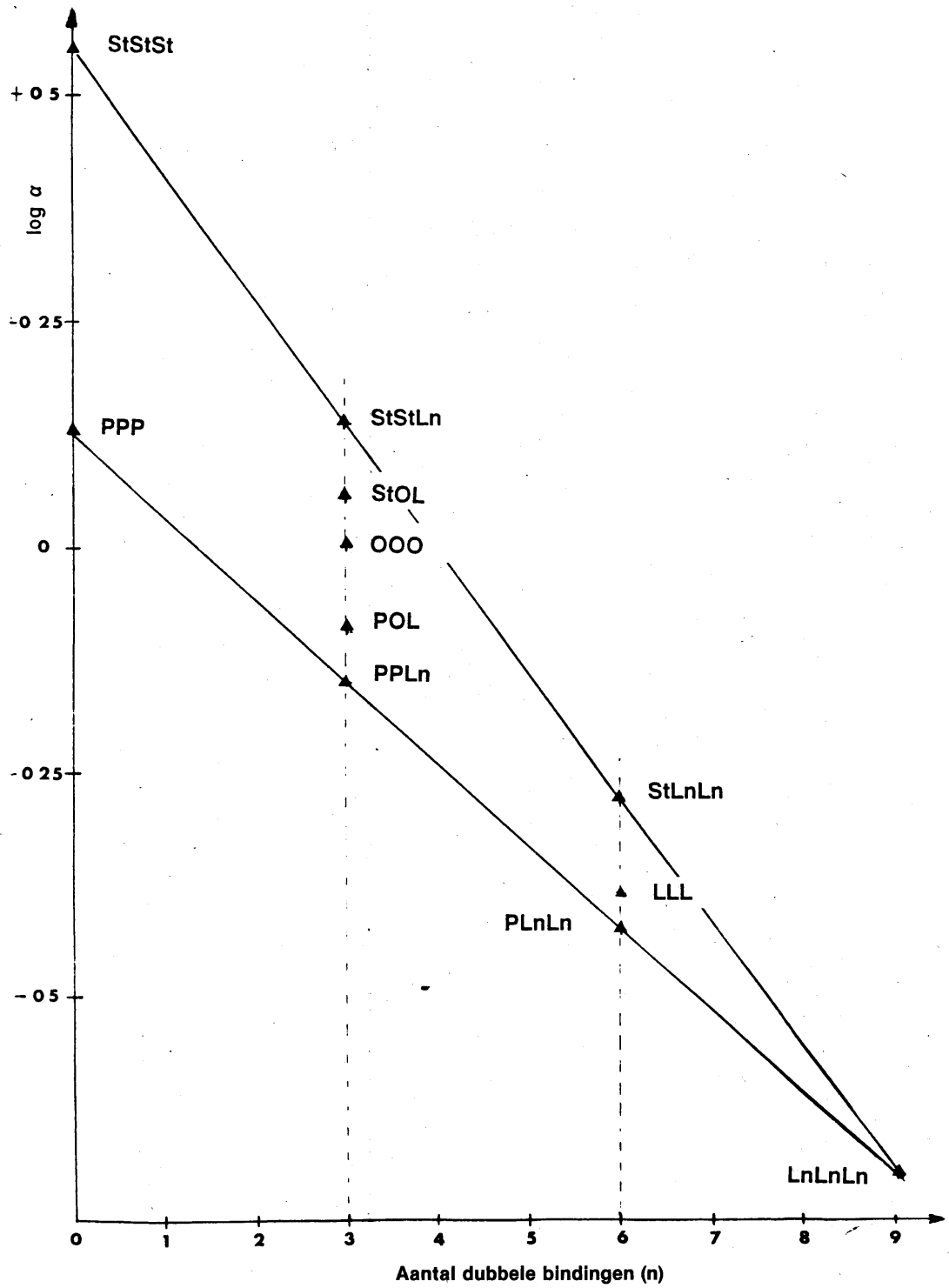
Chromatogram van een monster van sojaolie



P = palmitinezuur
 L = linolzuur
 St = stearinezuur
 Ln = linoleenzuur
 O = oliezuur

▼B

Figuur 2

Grafiek van $\log \alpha$ tegen f (aantal dubbele bindingen)

La = laurinezuur
 St = stearinezuur
 Ln = linoleenzuur
 My = myristinezuur
 O = oliezuur
 P = palmitinezuur
 L = linolzuur

▼B*BIJLAGE IX***SPECTROFOTOMETRISCH ONDERZOEK IN HET ULTRAVIOLETTE GEBIED**

Opmerking vooraf

Spectrofotometrisch onderzoek in het ultraviolette gebied kan informatie verschaffen over de kwaliteit van een vet, de toestand van bewaring en veranderingen veroorzaakt door technologische processen.

De absorptie bij de in deze methode aangegeven golflengten wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van dubbele en drievoudig onverzadigde systemen. Deze absorpties worden uitgedrukt als de specifieke extincties $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (de extinctie van een 1 % oplossing van het vet in het aangegeven oplosmiddel, bij een optische weglengte van 1 cm), en worden volgens afspraak als K, ook extinctiecoëfficiënt genoemd, opgegeven.

1. DOEL

Deze methode beschrijft de werkwijze voor de uitvoering van een spectrofotometrisch onderzoek van vetten in het ultraviolette gebied.

2. PRINCIPE VAN DE METHODE

Het te onderzoeken vet wordt opgelost in het vereiste oplosmiddel, vervolgens wordt de extinctie bepaald bij de opgegeven golflengten ten opzichte van het zuivere oplosmiddel. De specifieke extincties worden uit de aflezingen van de spectrofotometer berekend.

3. APPARATUUR

- 3.1. Een spectrofotometer, geschikt voor metingen in het ultraviolette gebied tussen 220 en 360 nm, instelbaar tot op de nm nauwkeurig.
- 3.2. Kwartscuvetten, met deksel, met een optische weglengte van 1 cm. Gevuld met water of een ander geschikt oplosmiddel mogen de cuvetten onderling geen verschillen vertonen groter dan 0,01 extinctie-eenheden.
- 3.3. Maatkolven van 25 ml.

▼M6

- 3.4. Chromatografiekolom waarvan het bovenste gedeelte 270 mm lang is en een doorsnede heeft van 35 mm en het onderste gedeelte 270 mm lang met een doorsnede van 10 mm.

▼B

4. REAGENTIA

- 4.1. Iso-octaan (2,2,4-trimethylpentaan), voor spectrofotometrische doeleinden: bij 220 nm moet dit ten opzichte van gedistilleerd water een transmissie hebben van ten minste 60 % en bij 250 nm van ten minste 95 %, of
 - cyclohexaan, voor spectrofotometrische doeleinden: bij 220 nm moet dit ten opzichte van gedistilleerd water een transmissie hebben van ten minste 40 % en bij 250 nm van ten minste 95 %.

▼M6**▼B**

- 4.2. Aluminiumhydroxide, voor kolomchromatografische doeleinden, voorbehandeld en gecontroleerd zoals omschreven in aanhangsel I.
- 4.3. Hexaan voor chromatografische doeleinden.

5. WERKWIJZE

- 5.1. Het te onderzoeken monster dient volledig homogeen te zijn en vrij van onzuiverheden. Oliën die bij kamertemperatuur vloeibaar zijn, worden over papier gefiltreerd bij een temperatuur van ongeveer 30 °C, vetten worden gehomogeniseerd en gefiltreerd bij een temperatuur die niet meer dan 10 °C boven het smeltpunt ligt.
- 5.2. Weeg nauwkeurig ongeveer 0,25 g van het voorbehandelde monster af in een maatkolf van 25 ml, vul aan tot de streep met het aangegeven oplosmiddel en homogeniseer. De verkregen oplossing moet volmaakt helder

▼B

zijn. Indien opalescentie of troebeling optreedt dient direct over papier te worden gefiltreerd.

- 5.3. Vul een cuvet met deze oplossing en meet de extincties ten opzichte van het oplosmiddel bij geschikte golflengten tussen 232 en 276 nm.

De gemeten extinctiewaarden moeten tussen 0,1 en 0,8 liggen. Zo niet, dan moeten de metingen worden herhaald bij een aangepaste inweeg van het monster.

- 5.4. Indien een meting van de specifieke extinctie is vereist na het doorlopen van de aluminiumoxidekolom, ga dan als volgt te werk. Breng in de chromatografiekolom 30 g aluminiumoxide in een hexaansuspensie. Verwijder, nadat de suspensie is uitgezakt, zoveel van de overmaat hexaan dat boven het aluminiumoxide nog ongeveer 1 cm hexaan staat. Los 10 g volgens punt 5.1 gehomogeniseerd en gefiltreerd vet op in 100 ml hexaan en giet de oplossing op de kolom. Verzamel het eluaat en verwijder het oplosmiddel onder vacuüm bij een temperatuur onder 25 °C. Met het aldus verkregen vet dient de bepaling onmiddellijk te worden voortgezet, zoals omschreven in punt 5.2.

6. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

- 6.1. Geef de specifieke extincties op, die bij de verschillende golflengten als volgt worden berekend:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s}$$

waarin:

- K_{λ} = specifieke extinctie bij golflengte λ ,
 E_{λ} = extinctie, gemeten bij golflengte λ ;
 c = gehalte van de oplossing, in g/100 ml;
 s = optische weglengte, in centimeter.

De resultaten dienen te worden opgegeven met twee cijfers achter de komma.

- 6.2. Het spectrofotometrisch onderzoek van olijfolie volgens de officiële bij de EEG-Verordening voorgeschreven methode vereist de bepaling van de specifieke extinctie in een iso-octaan oplossing bij golflengten van 232 en 270 nm en de bepaling van de grootte ΔK volgens de formule:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

waarin:

- K_m = de specifieke extinctie bij golflengte m , de golflengte van het absorptiemaximum bij ongeveer 270 nm.

▼B*AANHANGSEL I**Bereiding van de aluminiumoxidekolom en het testen van de activiteit*

A.1.1. Bereiding van de aluminiumoxidekolom

Breng in een hermetisch afsluitbare kolf een hoeveelheid aluminiumoxide, welke gedurende 3 uur in een oven bij een temperatuur van 380—400 °C is gedroogd, voeg per 100 g aluminiumoxide 5 ml gedistilleerd water toe, sluit de kolf onmiddellijk, schud regelmatig en laat vervolgens gedurende ten minste 12 uur staan alvorens dit te gebruiken.

A.1.2. Controle op de activiteit van het aluminiumoxide

Vul een chromatografiekolom met 30 g aluminiumoxide. Ga hierbij te werk zoals omschreven in punt 5.4 en leid een mengsel door bestaande uit:

- 95 % koudgeperste olijfolie van eerste persing met een specifieke extinctie van minder dan 0,18 bij 268 nm,
- 5 % bij de raffinage met aarde behandelde aardnotenolie met een specifieke extinctie van ten minste 4,0 bij 268 nm.

Indien de door de kolom gelopen vloeistof een specifieke extinctie van ten minste 0,11 bij 268 nm heeft dan kan het aluminiumhydroxide worden gebruikt, zo niet dan moet het percentage water worden opgevoerd.

▼B*AANHANGSEL II**IJking van de spectrofotometer*

- A.2. Het apparaat moet regelmatig (ten minste iedere 6 maanden) worden gecontroleerd op een correcte golflengteaanwijzing en op de nauwkeurigheid van de respons.
- A.2.1. De golflengte kan worden gecontroleerd met een kwiklamp of met geschikte filters.
- A.2.2. Ga, om de respons van de fotocel en de fotomultiplier te controleren, als volgt te werk: weeg 0,2000 g kaliumchromaat, voor spectrofotometrische doeleinden, af in een 1 000 ml maatkolf en los op in 0,05 M kaliumhydroxideoplossing en vul hiermee aan tot de streep. Pipetteer 25 ml van deze oplossing in een 500 ml maatkolf en vul aan tot de streep met dezelfde kaliumhydroxideoplossing.

Bepaal de extinctie van deze oplossing bij 275 nm, waarbij wordt gemeten tegen de kaliumhydroxideoplossing. De met een 1 cm cuvet gemeten extinctie moet $0,200 \pm 0,005$ bedragen.

▼B

BIJLAGE X.A

GASCHROMATOGRAFISCHE ANALYSE VAN METHYLESTERS VAN VETZUREN

1. DOEL

Deze norm beschrijft de kwalitatieve en kwantitatieve gaschromatografische bepaling met gepakte of capillaire kolom van een mengsel van methylesters van vetzuren, verkregen volgens bijlage X.B.

Deze norm kan niet worden toegepast op gepolymeriseerde vetzuren.

2. REAGENTIA

2.1. Draaggas

Inert gas (stikstof, helium, argon, waterstof, enz.), zeer goed gedroogd en met een zuurstofgehalte kleiner dan 10 mg/kg.

Opmerking 1: Waterstof, dat uitsluitend als draaggas wordt gebruikt bij capillaire kolommen, kan de snelheid van de analyse verdubbelen, maar is gevaarlijk. Veiligheidsvoorzieningen zijn verkrijgbaar.

2.2. Hulpgassen

2.2.1. Waterstof (zuiverheid ten minste 99,9 %), vrij van organisch materiaal.

2.2.2. Lucht of zuurstof, vrij van organisch materiaal.

2.3. Standaardmengsel

Een mengsel van methylesters van zuivere vetzuren of de methylesters van een vetstof met bekende samenstelling, bij voorkeur met dezelfde vetzuursamenstelling als het te analyseren monster.

Zorg ervoor oxidatie van meervoudig onverzadigde vetzuren te voorkomen.

3. APPARATUUR

De richtlijnen hebben betrekking op apparatuur die gewoonlijk wordt gebruikt bij gas/vloeistofchromatografie met een gepakte en/of capillaire kolom en een vlamionisatiedetector. Elk apparaat waarmee de efficiëntie en het scheidend vermogen zoals bepaald volgens en aangegeven in punt 4.1.2 kunnen worden bereikt, is geschikt.

3.1. Gaschromatograaf

De gaschromatograaf dient te bestaan uit de volgende onderdelen:

3.1.1. Injectiestuk

a) voor een gepakte kolom moet een injectiestuk worden gebruikt dat een zo klein mogelijke dode ruimte heeft (het injectiestuk moet kunnen worden verwarmd tot een temperatuur die 20 tot 50 °C hoger is dan die van de kolom);

b) voor capillaire koloms dient een speciaal ontworpen injectiestuk te worden gebruikt. Dit injectiestuk mag van het splittype zijn of van het kolominjectortype.

Opmerking 2: Indien geen vetzuren met minder dan 16 koolstofatomen aanwezig zijn, mag een beweegbare naaldinjector worden gebruikt.

3.1.2. Oven

De oven moet de kolom tot ten minste 260 °C kunnen verwarmen en de gekozen temperatuur op 1 °C nauwkeurig kunnen aanhouden voor een gepakte kolom en op 0,1 °C voor een capillaire kolom. De laatstgenoemde voorwaarde is van bijzonder belang wanneer een fused-silica capillaire kolom wordt gebruikt.

Het verdient aanbeveling steeds temperatuur-geprogrammeerde gaschromatografie toe te passen, in het bijzonder voor vetzuren met minder dan 16 koolstofatomen.

▼B

3.1.3. Gepakte kolom

3.1.3.1. Buis van een materiaal dat inert is ten opzichte van de te analyseren verbindingen (dat wil zeggen glas of roestvrij staal), van de volgende afmetingen:

- a) lengte: 1 tot 3 m. Er dient een relatief korte kolom te worden gebruikt als vetzuren met lange ketens (meer dan 20 C-atomen) aanwezig zijn. Voor de bepaling van C 4- en C 6-vetzuren wordt een kolom van twee meter aanbevolen;
- b) inwendige diameter: 2—4 mm.

Opmerking 3: In een roestvrij stalen kolom kunnen meervoudig onverzadigde componenten met meer dan drie dubbele bindingen zich onttleden.

Opmerking 4: Er mag een systeem met dubbele gepakte kolommen worden gebruikt.

3.1.3.2. Pakking

- a) *Drager:* zuurgewassen, gesilaniseerde diatomeeënaarde of elke andere geschikte inerte drager met een korrelgrootte tussen 125 en 200 µm (onderlinge verschillen niet groter dan 25 µm), afhankelijk van de inwendige diameter en de lengte van de kolom.
- b) *Stationaire fase:* type polyester van polaire vloeistof (bij voorbeeld van diëthyleenglycolpolysuccinaat, butaandiopolysuccinaat, ethyleenglycolpolyadipaat, enz.), cyaan-siliconen of elke andere vloeistof die de vereiste chromatografische scheiding mogelijk maakt (zie punt 4). De stationaire fase moet ongeveer 5—20 % (m/m) van de pakking uitmaken. Voor bepaalde scheidingen kunnen apolaire stationaire fasen worden gebruikt.

3.1.3.3. Conditionering van de kolom

Maak, indien mogelijk, de kolom los van de detector en verwarm de oven geleidelijk tot 185 °C; laat bij deze temperatuur gedurende ten minste 16 uur een stroom inert gas door de nieuwe kolom gaan met een snelheid van 20—60 ml/min. en bij 195 °C nog eens gedurende 2 uur.

3.1.4. Capillaire kolom

3.1.4.1. Buis van een materiaal dat inert is ten opzichte van de te analyseren verbindingen (gewoonlijk glas of fused silica). Inwendige diameter 0,2—0,8 mm. De binnenzijde dient een adequate behandeling te ondergaan (bij voorbeeld voorbehandeling van de oppervlakte, inactivering) voordat ze met de stationaire fase wordt gecoat. In de meeste gevallen is een kolom van 25 m voldoende.

3.1.4.2. Stationaire fase: gewoonlijk van het type polyglycol (poly(ethyleenglycol) 20 000), polyester (butaandiopolysuccinaat) of polair polysiloxaan (cyan-siliconen). Er mogen kruiselings verbonden kolommen worden gebruikt.

Opmerking 5: Polaire polysiloxanen kunnen moeilijkheden geven bij het identificeren en de scheiding van linoleenzuur en vetzuren van C₂₀.

De coating moet dun zijn, dat wil zeggen 0,1—0,2 µm.

3.1.4.3. Montage en conditionering van de kolom

Neem de gebruikelijke voorzorgen voor het monteren van capillaire kolommen, dat wil zeggen bevestiging van de kolom in de oven, keuze en montage van verbindingsstukken (lekken), plaatsing van de uiteinden van de kolom in de injector en de detector (beperking van dode ruimten). Leid een stroom van draaggas onder druk door de kolom (bij voorbeeld 0,3 bar (30 kPa) voor een kolom van 25 m lengte en een inwendige diameter van 0,3 mm).

Conditioneer de kolom door de temperatuur in de oven geprogrammeerd met 3 °C/min. te verhogen van de omgevingstemperatuur tot 10 °C onder de ontledingstemperatuur van de stationaire fase. Houd de oven gedurende 1 uur op deze temperatuur, tot stabilisatie van de basislijn. Verlaag de temperatuur tot 180 °C en werk onder isotherme omstandigheden.

Opmerking 6: In de handel zijn geschikte, reeds geconditioneerde kolommen verkrijgbaar.

▼B

3.1.5. Detector

De detector moet bij voorkeur verwarmd kunnen worden tot een temperatuur die hoger is dan de kolomtemperatuur.

3.2. **Injectiespuit**

Injectiespuit van maximaal 10 µl, met schaalverdeling in 0,1 µl.

3.3. **Registratieapparatuur**

Als de curve van de registratieapparatuur dient te worden gebruikt voor de berekening van de samenstelling van het geanalyseerde mengsel, is een elektronisch registratieapparaat met grote nauwkeurigheid vereist. Dit apparaat moet compatibel zijn met de overige apparatuur en dient de volgende kenmerken te hebben:

- a) responstijd kleiner dan 1,5 sec., liefst kleiner dan 1 sec. (de responstijd is de tijd die nodig is om de pen van het registratieapparaat van 0 tot 90 % te laten gaan bij een plotseling signaal van 100 %);
- b) papierbreedte: minimaal 20 cm;
- c) papiersnelheid: regelbaar van 0,4—2,5 cm/min.

3.4. **Rekenapparatuur (optioneel)**

Elektronische rekenapparatuur (bij voorbeeld een integrator) biedt de mogelijkheid snelle en nauwkeurige berekeningen uit te voeren. De integratie moet lineair zijn, een voldoende gevoeligheid hebben en de correctie van het eventuele verloop van de basislijn moet toereikend zijn.

4. WERKWIJZE

De in de punten 4.1 tot en met 4.3 beschreven handelingen betreffen het gebruik van een vlamionisatiedetector.

Als alternatief mag een gaschromatograaf met een katharometer (reagerend op verschillen in warmtegeleiding) worden gebruikt. De werkomstandigheden worden dan gewijzigd als beschreven in punt 6.

4.1. **Werkomstandigheden**

4.1.1. Bepaling van de optimale werkomstandigheden

4.1.1.1. Gepakte kolom

Bij het vaststellen van de optimale werkomstandigheden moet rekening worden gehouden met de volgende variabelen:

- a) lengte en diameter van de kolom;
- b) aard en hoeveelheid van de stationaire fase;
- c) temperatuur van de kolom;
- d) debiet van het draaggas;
- e) gewenst scheidend vermogen;
- f) de hoeveelheid van het monster, die zodanig moet worden gekozen dat de detector en de elektrometer een lineaire respons geven;
- g) duur van de analyse.

In het algemeen zullen bij de in de tabellen 1 en 2 vermelde waarden de gewenste resultaten worden verkregen, dat wil zeggen ten minste 2 000 theoretische schotels voor methylstearaat bij een elutie binnen ongeveer 15 min.

Als de apparatuur dit toelaat, dient het injectiestuk op een temperatuur te worden gebracht van ongeveer 200 °C en de detector op een temperatuur gelijk aan of hoger dan de kolomtemperatuur.

Het debiet van de waterstof naar de vlamionisatiedetector dient in het algemeen, afhankelijk van de diameter van de kolom, 0,5 tot 1 maal het debiet van het draaggas te zijn. Het debiet van de zuurstof is ongeveer 5 tot 10 maal zo groot als die van de waterstof.

▼ **B**

Tabel 1

Inwendige diameter van de kolom (mm)	Debiet van het draaggas (ml/min.)
2	15 tot 25
3	20 tot 40
4	40 tot 60

Tabel 2

Concentratie van de stationaire fase (% (m/m))	Kolomtemperatuur (°C)
5	175
10	180
15	185
20	185

4.1.1.2. Capillaire kolom

De efficiëntie en permeabiliteit van capillaire kolommen brengen mee dat de scheiding tussen de componenten en de duur van de analyse sterk afhankelijk zijn van het debiet van het draaggas in de kolom. Daarom moeten de werkomstandigheden worden geoptimaliseerd door aanpassing van deze variabele (of eenvoudiger door beïnvloeding van het drukverval van de kolom), naar gelang men de scheiding wenst te verbeteren of een snelle analyse wenst.

4.1.2. Bepaling van het aantal theoretische schotels (efficiëntie) en van het scheidend vermogen

(Zie figuur 1.)

Voer de analyse uit met een mengsel van ongeveer gelijke hoeveelheden methylstearaat en -oleaat (bij voorbeeld methylesters van cacaoboter).

Kies de kolomtemperatuur en het debiet van het draaggas zodanig dat het maximum van de methylstearaatpiek ongeveer 15 minuten na de oplosmiddelpiek wordt geregistreerd. Gebruik een hoeveelheid van het mengsel van methylesters die groot genoeg is om een methylstearaatpiek te krijgen die tot ongeveer driekwart van de hele schaal reikt.

Bereken het aantal theoretische schotels „n” (efficiëntie) met de formule:

$$n = 16 \left[\frac{dr_1}{w_1} \right]^2$$

en het scheidend vermogen „R” met de formule:

$$R = \frac{2\Delta}{w_1 + w_2}$$

waarin:

dr_1 = de retentie-afstand, in millimeter, vanaf de start van het chromatogram tot het maximum van de piek van methylstearaat;

w_1 en w_2 = de basisbreedten, in millimeter, van de pieken voor methylstearaat en -oleaat, gemeten tussen de snijpunten van de raaklijnen aan de buigpunten met de basislijn;

Δ = de afstand, in millimeter, tussen de respectieve piekmaxima van methylstearaat en -oleaat;

▼ **M2**

en de resolutiefactor „I_r” met de formule

▼ M2

$$\frac{a}{b}$$

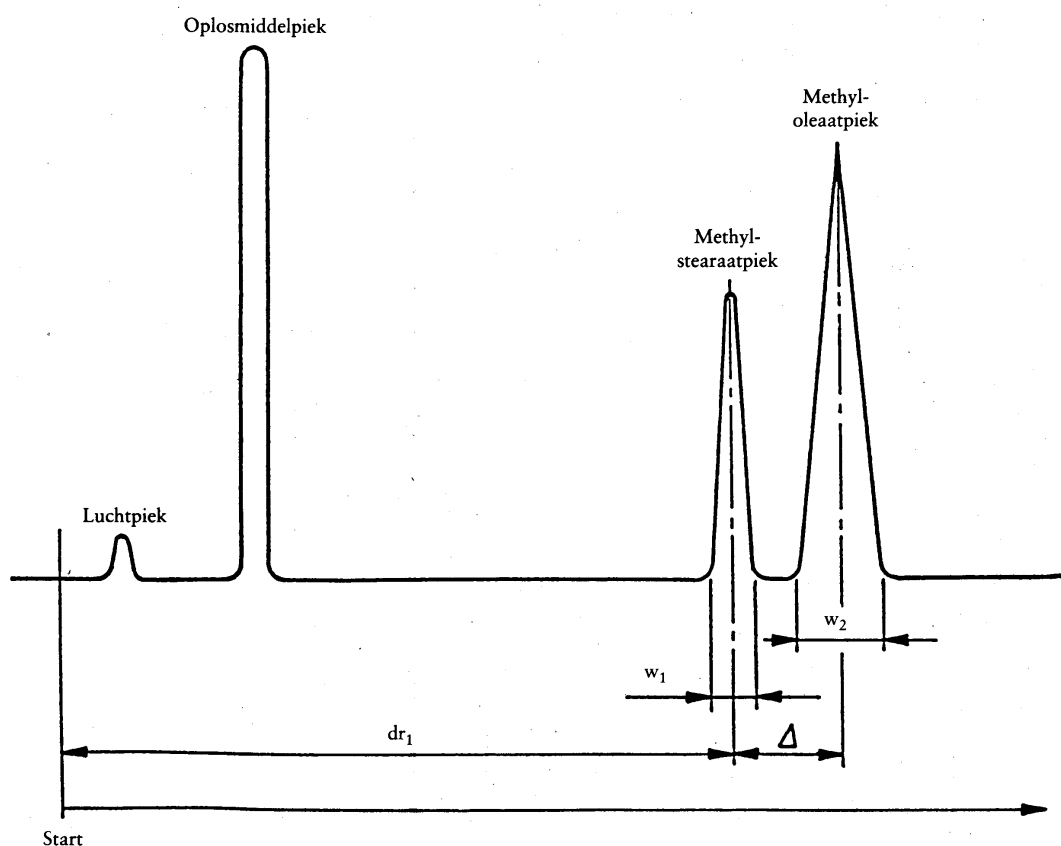
waarin:

- a = de hoogte van de laagste piek gemeten ten opzichte van de basislijn;
 b = de hoogte van het laagste punt van het dal tussen de twee aangrenzende pieken, gemeten ten opzichte van de basislijn.

▼ B

Figuur 1

Chromatogram voor bepaling van het aantal theoretische schotels (efficiëntie) en het scheidend vermogen



De werkomstandigheden voor de analyse moeten zo worden gekozen dat per meter kolom voor methylstearaat ten minste 2 000 theoretische schotels en een scheidend vermogen van ten minste 1,25 worden verkregen.

4.2. **Analysemonster**

Neem met de injectiespuit (3.2) 0,1 tot 2 µl van de oplossing van methylesters die is bereid volgens bijlage X.B en injecteer die in de kolom.

Bereid in het geval van esters die niet zijn opgelost, een oplossing van ongeveer 100 mg/ml in heptaan voor chromatografische doeleinden en injecteer 0,1 tot 1 µl.

Als de analyse betrekking heeft op componenten die slechts in sporehoeveelheden aanwezig zijn, mag het analysemonster (tot het tienvoudige) worden vergroot.

4.3. **Analyse**

De meeste monsters kunnen bij de onder 4.1.1 beschreven werkomstandigheden worden geanalyseerd.

Er kan echter bij een lagere kolomtemperatuur worden gewerkt, wanneer het een analyse betreft van vetzuren met minder dan 12 kool-

▼B

stofatomen, of bij een hogere temperatuur voor een analyse van vetzuren met meer dan 20 koolstofatomen. Soms kan in beide gevallen temperatuurprogrammering worden toegepast. Voorbeeld: injecteer, indien het monster methylesters bevat van vetzuren met minder dan 12 koolstofatomen, het monster bij 100 °C (of bij 50—60 °C bij aanwezigheid van boterzuur) en programmeer dan direct naar de optimale temperatuur met 4—8 °C/ minuut. In sommige gevallen mogen beide werkwijzen worden gecombineerd.

Na de geprogrammeerde verwarming wordt de elutie isotherm voortgezet totdat alle componenten zijn geëluëerd. Als de gaschromatograaf geen inrichting voor temperatuurprogrammering heeft, wordt aanbevolen bij twee verschillende temperaturen tussen 100 en 195 °C te analyseren.

Aanbevolen wordt zo nodig een analyse uit te voeren met twee stationaire fasen van verschillende polariteit om na te gaan dat er geen over elkaar vallende pieken zijn, bij voorbeeld in het geval dat $C_{18:3}$ en $C_{20:0}$ of $C_{18:3}$ en geconjugeerd $C_{18:2}$ tegelijk voorkomen.

4.4. Referentiechromatogram en referentiegrafieken

Bepaal uit een analyse van het standaardmengsel (2.3) die onder dezelfde omstandigheden wordt uitgevoerd als voor het onderzoek van het monster, de retentietijden of retentieafstanden voor de samenstellende vetzuren. Maak op semi-logaritmisch papier, voor een bepaalde graad van onverzadigdheid, een grafiek door de logaritme van de retentietijd of retentieafstand als functie van het aantal koolstofatomen uit te zetten. Onder isotherme omstandigheden zullen voor esters met een rechte keten en een bepaalde graad van onverzadigdheid de getekende curven vrijwel evenwijdig lopende rechte lijnen zijn.

Het is noodzakelijk omstandigheden te vermijden die leiden tot over elkaar vallende pieken, dat wil zeggen dat de resolutie onvoldoende is om twee componenten te scheiden.

5. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

5.1. Kwalitatieve analyse

Identificeer de methylesterpieken van het analysemonster met behulp van de volgens 4.4 gemaakte grafieken, zo nodig via interpolatie.

5.2. Kwantitatieve analyse

5.2.1. Bepaling van de samenstelling

Gebruik, behoudens uitzonderingen, de methode van de interne normalisatie, dat wil zeggen ga er van uit dat alle componenten van het monster op het chromatogram worden weergegeven, zodat het totaal van de oppervlakken onder de pieken 100 % weergeeft van de bestanddelen (totale elutie).

Als de apparatuur voorzien is van een integrator, gebruik dan de hiermee verkregen getallen. Als dat niet het geval is, bepaal dan het oppervlak onder elke piek door middel van driehoeksmeting, dat wil zeggen door vermenigvuldiging van de piekhoogte met de piekbreedte op halve hoogte, en houd, indien nodig, rekening met de verschillende verzwakkerstanden tijdens het opnemen van het chromatogram.

5.2.2. Berekening

5.2.2.1. Algemeen te volgen methode

Bereken het gehalte van een bepaalde component i , uitgedrukt als een massapercentage van de methylesters, door het percentage van het oppervlak van de betrokken piek te bepalen ten opzichte van het totale piekoppervlak, met de formule:

$$\frac{A_i}{\Sigma A} \cdot 100$$

waarin:

- A_i = het oppervlak van de piek van component i ;
- ΣA = de som van de oppervlakken van alle pieken.

Geef het resultaat op met één decimaal.

▼B

Opmerking 7: In dit algemene geval wordt het resultaat van de berekening op grond van de relatieve oppervlakken geacht de massapercentages weer te geven. Zie punt 5.2.2.2 voor de gevallen waarin dit niet mag worden aangenomen.

5.2.2.2. Gebruik van correctiefactoren

In bepaalde gevallen, met name bij aanwezigheid van vetzuren met minder dan 8 koolstofatomen of van zuren met secundaire groepen en indien een katharometer wordt gebruikt of wanneer zeer nauwkeurige analyses nodig zijn, moeten correctiefactoren worden gebruikt om de percentages van de piekoppervlakken om te rekenen in massapercentages van de componenten.

Bepaal de correctiefactoren met behulp van een chromatogram dat is verkregen via de analyse van een standaardmengsel van methylesters waarvan de samenstelling nauwkeurig bekend is en die is uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden als voor het onderzoek van het monster.

Voor het standaardmengsel wordt het percentage (m/m) van component *i* berekend met de formule:

$$\frac{m_i \cdot 100}{\Sigma m}$$

waarin:

m_i = de massa van component *i* in het standaardmengsel;

Σm = de som van de massa's van de verschillende componenten van het standaardmengsel.

Bereken uit het chromatogram van het standaardmengsel (4.4) het percentage (oppervlak/oppervlak) van component *i* op de volgende wijze:

$$\frac{A_i \cdot 100}{\Sigma A}$$

waarin:

A_i = het oppervlak van de piek van component *i*;

ΣA = de som van de oppervlakken van alle pieken.

De correctiefactor wordt nu berekend als volgt:

$$K_i = \frac{m_i \cdot \Sigma A}{A_i \cdot \Sigma m}$$

Gewoonlijk worden de correctiefactoren uitgedrukt in relatieve factoren ten opzichte van de correctiefactor van $K_{C_{16}}$; de relatieve correctiefactoren zijn:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C_{16}}}$$

In het monster wordt het gehalte van een component *i*, uitgedrukt als massapercentage van de methylesters, berekend via:

$$\frac{K'_i \cdot A_i}{\Sigma (K'_i \cdot A_i)} \cdot 100$$

Geef de resultaten op met één decimaal.

5.2.2.3. Gebruik van een interne standaard

In bepaalde gevallen (met name wanneer niet alle zuren worden bepaald, zoals wanneer vetzuren met 4 en 6 koolstofatomen voorkomen naast vetzuren met 18 en 19 koolstofatomen, of bij bepaling van de absolute hoeveelheid van een vetzuur in een monster) moet een interne standaard worden gebruikt. Daarvoor wordt vaak gebruik gemaakt van C_5 , C_{15} of C_{17} . Dan moet de correctiefactor voor de interne standaard bepaald.

Het percentage (m/m) van component *i* uitgedrukt in methylesters wordt dan berekend met de formule:

▼B

$$\frac{m_s \cdot K'_i \cdot A_i}{m \cdot K'_s \cdot A_s} \cdot 100$$

waarin:

A_i = het piekoppervlak van component i ;

A_s = het piekoppervlak van de interne standaard;

K'_i = de relatieve correctiefactor voor component i ten opzichte van K_{C16} ;

K'_s = de relatieve correctiefactor voor de interne standaard ten opzichte van K_{C16} ;

m = de massa van het monster, in milligram;

m_s = de massa van de interne standaard, in milligram.

Geef de resultaten op met één decimaal.

▼M2

6. BIJZONDERE SITUATIE: BEPALING VAN DE TRANS-ISOMEREN

Het is mogelijk om het percentage trans-isomeren in vetzuren met een aantal koolstofatomen tussen 10 en 24 te bepalen via scheiding van de methylesters door gebruik van capillaire kolommen met een bepaalde polariteit.

6.1. Fused-silica capillaire kolom met een lengte van 50 m, inwendige diameter van 0,25-0,32 mm, inwendig gecoat met cyaanpropylsiliconen in een dikte van 0,1-0,3 μm (type SP 2340, type SP 2380, CP Sil 88, Silor 10 of equivalent).

6.2. De methylesters worden bereid volgens werkwijze B van bijlage X.B. De vetstoffen met een zuurtegraad hoger dan 3 % moeten eerst worden geneutraliseerd overeenkomstig punt 6.1 van bijlage VII.

6.3. Als richtlijn voor de werkomstandigheden kunnen de volgende waarden dienen:

— kolomtemperatuur geprogrammeerd van 150 °C — 230 °C (b.v. 165 °C gedurende 15 minuten vervolgens oplopend met 5° per minuut tot 200 °C);

— temperatuur van het injectiestuk: 250 °C als het splitsysteem wordt gebruikt of bij het kolominjectortype dezelfde begintemperatuur als de kolom;

— temperatuur van de detector: 260 °C;

— debiet van het draaggas (helium of waterstof): 1,2 ml per minuut.

Injecteer een zodanige hoeveelheid dat bij de toegepaste gevoeligheid de hoogte van de piek voor methylester van arachidezuur niet lager is dan 20 % van de volle schaaluitslag.

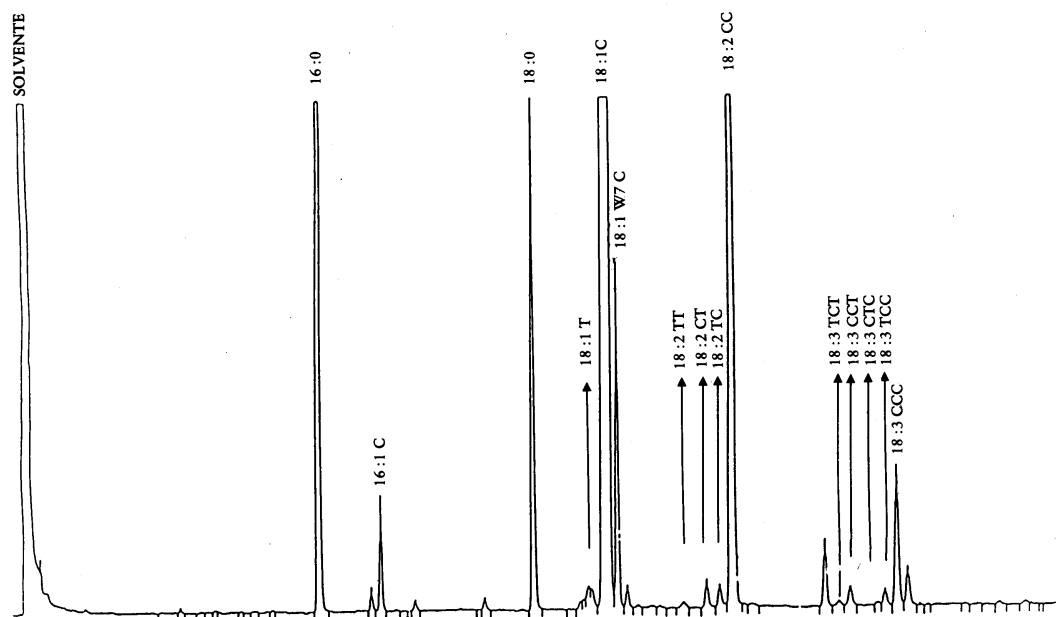
6.4. De verschillende methylesters worden geïdentificeerd op basis van de retentietijden en door een vergelijking met standaardmengsels (zie punt 2.3).

De esters van de trans-vetzuren worden geëluëerd voor de daarmee corresponderende cis-isomeren. Fig. 2 geeft een voorbeeld van een chromatogram.

▼ M2

Figuur 2

Gaschromatogram van de bepaling van trans-isomeren van vetzuren, met gebruikmaking van een capillaire kolom



- 6.5. De efficiëntie van de kolom, zoals bepaald overeenkomstig 4.1.2 moet scheiding van een aantal kritische koppels geven, zoals b.v. het koppel van de trans-iso-oliezuren en de piek van oliezuur, trans C 18: 1/cis C 18: 1, met een resolutiefactor van meer dan 2.
- 6.6. Het percentage van de afzonderlijke trans-vetzuren wordt berekend aan de hand van de verhouding tussen het oppervlak van de betrokken piek ten opzichte van het totale piekoppervlak.

De in aanmerking te nemen percentages zijn die van de volgende zuren:

- trans-octadecenezuren (T 18: 1), in bijlage I van deze verordening aangeduid als het totaal van de isomeren van trans-oliezuren;
- cis-trans- en trans-cis-octadecadieenezuren [CT + TC] 18:2], in bijlage I van deze verordening aangeduid als het totaal van de isomeren van trans-linolzuren;
- trans-cis-trans-, cis-cis-trans-, cis-trans-cis-, trans-cis-cis-octadecatrienezuren [(TCT + CCT + CTC + TCC)18: 3], in bijlage I van deze verordening aangeduid als het totaal van de isomeren van trans-linoleenzuren.

Opmerking 8: Gelet op de bijzondere kenmerken van deze methode, moeten de resultaten worden opgetekend met twee decimalen.

▼ B

► M2 7. ◀ BIJZONDERE SITUATIE — GEBRUIK VAN EEN KATHAROMETER (REAGEREND OP VERSCHILLEN IN WARMTEGELEIDING)

Voor de bepaling van de kwalitatieve en kwantitatieve samenstelling van een mengsel van methylesters van vetzuren mag ook een warmtegeleidingsdetector (katharometer) worden gebruikt.

De in de punten 3 en 5 vernielde aanwijzingen moeten dan worden aangepast zoals vermeld in tabel 3.

Voor kwantitatieve analyse moeten de in punt 5.2.2.2 gedefinieerde correctiefactoren worden gebruikt.

▼ **B**

Tabel 3

Variabele	Waarde/voorwaarde
Kolom	Lengte: 2—4 m Inwendige diameter: 4 mm
Drager	Korrelgrootte tussen 160 en 200 µm
Bedekkingsgraad	15 % (m/m) — 25 % (m/m)
Draaggas	Helium of, indien niet voorhanden, waterstof met een zo laag mogelijk zuurstofgehalte
Hulpgasen	Geen
Temperatuur van het injectiestuk	40 tot 60 °C boven de kolomtemperatuur
Kolomtemperatuur	Tussen 180 en 200 °C
Debiet van het draaggas	Tussen 60 en 80 ml/minuut
Geïnjecteerde hoeveelheden	Tussen 0,5 en 2 µl

► **M2** 8. ◀ **VERSLAG**

Vermeld in het verslag de resultaten en de methoden die zijn gebruikt voor de bereiding van de methylesters en de gaschromatografische analyse. Vermeld tevens details bij de uitvoering die niet in deze internationale norm zijn aangegeven of die als optioneel worden beschouwd, en voorts bijzonderheden die waarschijnlijk van invloed zijn geweest op de resultaten.

Geef in het verslag alle gegevens die nodig zijn voor de volledige identificatie van het monster.

▼ **M19***BIJLAGE X.B***BEREIDING VAN METHYLESTERS VAN VETZUREN VAN OLIJFOLIE EN OLIE UIT AFVALLEN VAN OLIJVEN**

Beide onderstaande methoden worden aanbevolen voor de bereiding van methylesters van vetzuren van olijfolie en olie uit afval van olijven.

Methode A: Koude omestering door middel van een methanoloplossing van kaliumhydroxide.

Methode B: Warme methylering door middel van een methanoloplossing van natriummethylaas, gevolgd door een verestering in een zuur milieu.

De keuze van de methode hangt af van de te bepalen analytische parameter en de categorie van de olie, zoals hieronder vermeld:

a) Bepaling van het verschil tussen het werkelijke en het theoretische gehalte aan triglyceriden volgens ECN42 (Δ ECN42):

— Methode A wordt toegepast op monsters van alle categorieën olie, nadat de olie is gezuiverd via een kolom van silicagel.

b) Bepaling van de vetzuursamenstelling:

— Methode A wordt direct toegepast op monsters van de hieronder volgende categorieën olie:

— Olijfoliën van de eerste persing met een gehalte aan vrije vetzuren van minder dan 3,3 %.

— Geraffineerde olijfolie.

— Olijfolie (mengsel van olijfoliën van de eerste persing en geraffineerde olijfolie).

— Geraffineerde olie uit afval van olijven.

— Olie uit afval van olijven (mengsel van olijfoliën van de eerste persing en geraffineerde olie uit afval van olijven).

— Methode B wordt direct toegepast op monsters van de hieronder volgende categorieën olie:

— Olijfolie van de eerste persing met een gehalte aan vrije vetzuren van meer dan 3,3 %.

— Ruwe olie uit afval van olijven.

c) Bepaling van de vetzuren van de trans-isomeren:

— Methode A wordt direct toegepast op monsters van de hieronder volgende categorieën olie:

— Olijfoliën van de eerste persing met een gehalte aan vrije vetzuren van minder dan 3,3 %.

— Geraffineerde olijfolie.

— Olijfolie (mengsel van olijfoliën van de eerste persing en geraffineerde olijfolie).

— Geraffineerde olie uit afval van olijven.

— Olie uit afval van olijven (mengsel van olijfoliën van de eerste persing en geraffineerde olie uit afval van olijven).

— Methode B wordt toegepast op monsters van de volgende categorieën olie, nadat de olie is gezuiverd via een kolom van silicagel:

— Olijfolie van de eerste persing met een gehalte aan vrije vetzuren van meer dan 3,3 %.

— Ruwe olie uit afval van olijven.

ZUIVERING VAN OLIEMONSTERS

Indien nodig worden de monsters gezuiverd door deze door een kolom silicagel te voeren; als oplosmiddel voor elutie wordt hexaan/diethyloxyde (87:13 v/v) gebruikt, zoals beschreven in de IUPAC 2.507-methode.

Het is ook mogelijk als alternatief extractie in de vaste fase toe te passen, onder gebruikmaking van patronen silicagel. Plaats een patroon silicagel (1 g, 6 ml) in een apparaat voor elutie onder vacuüm en was met 6 ml hexaan. Hef het vacuüm op om te voorkomen dat de kolom uitdroogt. Breng vervolgens in de kolom een oplossing van olie (ongeveer 0,12 g) in 0,5 ml hexaan en pas het vacuüm weer toe, opdat de oplossing in het silicium binnendringt; elueer vervolgens met 10 ml hexaan/diethyloxyde (87:12 v/v) onder vacuüm. Homogeniseer het totaal van de eluaten en verdeel deze in twee gelijke volumes. Laat een van de volumes tot uitdroging verdampen in een draaibaar verdampstelsel onder verminderde druk en bij omgevingstemperatuur. Los het residu op in 1 ml

▼ **M19**

heptaan. De verkregen oplossing is klaar voor de analyses van vetzuren door CPG. Laat het tweede volume verdampen en los het residu op in 1 ml aceton voor de analyse van de triglyceriden door HPCL, indien nodig.

METHODEN VOOR DE BEREIDING VAN DE METHYLESTERS VAN VETZUREN

1. **Methode A: Koude omestering door middel van een methanoloplossing van kaliumhydroxide**

1.1. **Toepassing**

Deze snelle methode wordt toegepast op olijfolie en olie uit afval van olijven met een gehalte aan vrije vetzuren van minder dan 3,3 %. De vrije vetzuren worden niet veresterd door het kaliumhydroxide. De ethylesters van vetzuren transveresteren langzamer dan de glycerideesters en het is mogelijk dat zij slechts gedeeltelijk methyleren.

1.2. **Principe**

De methylesters worden gevormd door omestering in een methanoloplossing van kaliumhydroxide, als tussenfase voor de verzeeping (punt 5 van de methode in ISO 5509:2000, punt 5 van de IUPAC 2.301-methode).

1.3. **Reagentia**

Methanol met hoogstens 0,5 % (m/m) water.

Heptaan voor chromatografie.

Kaliumhydroxide, methanoloplossing van ca. 2 N: los 11,2 kaliumhydroxide op in 100 ml methanol.

1.4. **Materiaal**

Reageerbuisjes met schroefsluiting (capaciteit 5 ml), met een dop die voorzien is van een PTFE-dichting.

Pipetten, met schaalverdeling of automatische, van 2 ml en 0,2 ml.

1.5. **Werkwijze**

Weeg ca. 0,1 g van het oliemonster af in een reageerbuisje van 5 ml met schroefsluiting. Voeg 2 ml heptaan toe en schud. Voeg 0,2 ml van de methanoloplossing van 2 N kaliumhydroxide toe, sluit met behulp van de dop die van een PTFE-dichting is voorzien, sluit goed af en schud krachtig gedurende 30 seconden. Laat rusten totdat het bovenste deel van de oplossing helder wordt. Schenk de bovenste laag af; dat is de laag waarin zich de methylesters bevinden. De heptaanoplossing is gereed om in de chromatograaf ingebracht te worden. Het verdient aanbeveling om de oplossing in de koelkast te laten tot het ogenblik van de chromatografische analyse. Het is af te raden de oplossing langer dan twaalf uur te bewaren.

2. **Methode B: Warme methylering met behulp van een methanoloplossing van natriummethylaat, gevolgd door een verestering in een zuur milieu**

2.1. **Toepassing**

Deze methode is van toepassing op olijfolie en olie uit afval van olijven met een gehalte aan vrije vetzuren van meer dan 3,3 %.

2.2. **Principe**

Neutralisering van de vrije vetzuren en alkalische methanolisering van glyceriden, gevolgd door verestering van de vetzuren in een zuur milieu (punt 4.2 van de IUPAC 2.301-methode).

2.3. **Reagentia**

— Heptaan voor chromatografie.

— Methanol met hoogstens 0,05 % water (m/m).

— Natriummethylaat, 0,2 N methanoloplossing: los 5 g natrium op in 1 000 ml methanol (kan worden bereid met behulp van handelsoplossingen).

▼ **M19**

- Fenolftaleïne, 0,2 methanoloplossing.
- Zwavelzuur in de 1 N methanoloplossing: voeg 3 ml zwavelzuur van 96 % toe aan 100 ml methanol.
- Verzadigde oplossing van natriumchloride in het water.

2.4. Materiaal

- Volumetrische kolf met een capaciteit van 50 ml, met platte bodem en lange, nauwe geslepen hals.
- Terugstroomkoeler. Luchtkoeler (1 m lang) voorzien van een geslepen dichting.
- Kookregelaar.
- Glazen trechter.

2.5. Werkwijze

Schenk ongeveer 0,25 g oliemonster in een volumetrische kolf van 50 ml met een geslepen hals. Voeg met behulp van de trechter 10 ml van de 0,2 N methanoloplossing van natriummethylaat en de kookregelaar toe. Bevestig de terugstroomkoeler, schud en breng aan de kook. De oplossing moet na ongeveer tien minuten helder worden. Na 15 minuten is de reactie praktisch voltooid. Neem de kolf van de warmtebron, wacht het einde van de terugstroom af, verwijder de koeler en voeg twee druppels van de fenolftaleïneoplossing toe. Voeg enkele ml 1 N zwavelzuur toe aan de methanoloplossing totdat deze kleurloos wordt; voeg er daarna nog eens 1 ml aan toe. Sluit de koeler aan en breng opnieuw aan de kook gedurende ongeveer 20 minuten. Neem de kolf van de warmtebron en laat afkoelen onder een luchtstroom. Verwijder de koeler, voeg 20 ml van de verzadigde natriumchlorideoplossing toe en schud. Voeg 5 ml heptaan toe, sluit de kolf en schud krachtig gedurende 15 seconden.

Laat bezinken tot de volledige scheiding van de twee fasen. Voeg opnieuw 20 ml van de verzadigde natriumchlorideoplossing toe, totdat de waterige fase het onderste deel van de hals van de kolf bereikt. De bovenste laag die zich in de hals van de kolf bevindt, is de laag die de methylesters bevat. De verkregen oplossing is gereed om in de chromatograaf te worden ingebracht.

Voorzorgsmaatregel: De methylering volgens methode B moet in een geventileerde zuurkast worden uitgevoerd.

2.6. Alternatieven voor de methylering volgens methode B**2.6.1. Methode C****2.6.1.1. Principe**

De te analyseren vetstof wordt, bij 100 °C, behandeld met een methanoloplossing van zoutzuur in een gesloten flesje.

2.6.1.2. Materiaal

- Flesje van dik glas met een inhoud van ca. 5 ml (hoogte 40 x 45 mm, diameter 14 à 16 mm).
- Pipetten, met schaalverdeling, van 1 en 2 ml.

2.6.1.3. Reagentia

Oplossing van zoutzuur in 2 % methanol, bereid uit gasvormig zoutzuur en waterdampvrij methanol (opmerking 1).

Hexaan voor chromatografie

Opmerking 1: Het is mogelijk handelsoplossingen van zoutzuur in methanol te gebruiken. In het laboratorium kunnen gemakkelijk kleine hoeveelheden gasvormig zoutzuur worden bereid en wel door de handelsoplossing ($p = 1,18$) te wijzigen, door de toevoeging van enkele druppels geconcentreerd zwavelzuur. Aangezien methanol zeer gemakkelijk zoutzuur opneemt, is het goed bij de oplossing alle mogelijke voorzorgsmaatregelen te treffen (bijvoorbeeld het gas inbrengen met behulp van een kleine omgekeerde trechter, die juist reikt tot het niveau van het methanol). Het is mogelijk vooraf grote hoeveelheden methanoloplossingen van zoutzuur te bereiden, die in het donker, in flessen met een glazen stop, uitstekend bewaard kunnen worden. Dit

▼ **M19**

reagens kan eveneens worden bereid door acetylchloride op te lossen in het waterrijke methanol.

2.6.1.4. Werkwijze

- Schenk in het glazen flesje 0,2 g van de vetstof die vooraf is gedroogd aan natriumsulfaat en gefiltreerd en daarna 2 ml van de methanoloplossing van zoutzuur. Sluit het flesje.
- Dompel het flesje gedurende 40 minuten onder bij 100 °C.
- Laat het flesje onder een luchtstroom afkoelen, open het en voeg 2 ml gedestilleerd water en 1 ml hexaan toe.
- Centrifugeer en extraheer de hexaanfase, gereed voor gebruik.

2.6.2. *Methode D*

2.6.2.1. Principe

De geanalyseerde vetstof wordt onder terugstroming verhit met methanol, hexaan en zwavelzuur. De verkregen methylesters worden geëxtraheerd met petroleumether.

2.6.2.2. Materiaal

- Proefbuis met een capaciteit van ca. 20 ml met een terugstroomkoeler (met behulp van lucht) van ca. 1 m lang, voorzien van een geslepen dichting.
- Pipet, met schaalverdeling, van 5 ml.
- Afschenktrechter van 50 ml.
- Reageerbuisjes van 10 ml en 25 ml.
- Proefbuis, met konische bodem, van 15 ml.

2.6.2.3. Reagentia

- Reagens voor methylering: waterrij methanol, hexaan en geconcentreerd zwavelzuur (p = 1,84 in de verhouding 75:25:1 (V/V/V)).
- Petroleumether 40-60 °C.
- Waterrij natriumsulfaat.

2.6.2.4. Werkwijze

Schenk 0,1 g olie in de buis van 20 ml en voeg 5 ml van het methyleeringsreagens toe.

Bevestig de terugstroomkoeler en verwarm gedurende 30 minuten tot kookpunt in een waterbad (opmerking 2).

Breng het mengsel kwantitatief over naar een afschenktrechter van 50 ml met 10 ml gedestilleerd water en 10 ml petroleumether. Schud krachtig en wacht totdat de scheiding van de fasen plaats heeft gevonden. Scheid de waterachtige fase en was de geëtherde laag tweemaal met 20 ml gedestilleerd water. Voeg in de trechter een kleine hoeveelheid waterrij natriumsulfaat toe, schud, laat enkele minuten rusten en filtreer, waarbij het filtraat in een buis van 15 ml met konische bodem wordt opgevangen.

Laat het oplosmiddel verdampen in een waterbad onder een stikstofstroom.

Opmerking 2: Breng, om kookvertraging te voorkomen, een glazen staafje in de buis en laat de temperatuur van het waterbad niet boven 90 °C stijgen.

3. *Precisieparameters*

De statistische evaluatie van de nauwkeurigheid van de methoden A en B is gepubliceerd door de Internationale Olijfolieraad in zijn methode COI/T.20/CO. nr. 24.

AANBEVELINGEN VOOR DE GASCHROMATOGRAFISCHE ANALYSE IN DE GASFASE VAN DE ESTERS VAN VETZUREN VAN OLIJFOLIE EN OLIE UIT AFVALLEN VAN OLIJVEN

1. *Werkwijze*

De gaschromatografische analyse in de gasfase van oplossingen van vetesters in hexaan wordt uitgevoerd overeenkomstig de norm ISO 5508, met behulp van een capillaire kolom (50 m lang x 0,25 of 0,32 mm binnenwerkse diameter), bedekt met cyanopropylsilicon, zoals aangegeven voor de bepaling van vetzuren en trans-isomeren (COI/T.20/Doc. nr. 17).

▼ **M19**

Figuur 1 laat het typerende chromatografische profiel zien van een olie uit afvallen van olijven die methyl- en ethylesters bevat van vetzuren en trans-isomeren van methylesters.

2. **Berekeningen**

- 2.1. Om de vetzuursamenstelling en Δ ECN42 te berekenen, moet met de volgende vetzuren rekening worden gehouden:

Myristinezuur (C14:0).

Palmitinezuur (C16:0). Som van de oppervlakken van de pieken die overeenkomen met de methyl- en de ethylesters.

Palmitoleïnezuur (C16:1). Som van de oppervlakken van de pieken die overeenkomen met de isomeren ω 9 en ω 7 van het methylester, het ethylester en de trans-isomeren van het methylester.

Heptadekaanzuur (C17:0).

Heptadecenzuur (C17:1).

Stearinezuur (C18:0).

Oleïnezuur (C18:1). Som van de oppervlakken van de pieken die overeenkomen met de isomeren ω 9 en ω 7 van het methylester, het ethylester en de trans-isomeren van het methylester.

Linolzuur (C18:2). Som van de oppervlakken van de pieken die overeenkomen met de methyl- en ethylesters en de trans-isomeren van het methylester.

Arachidonzuur (C20:0).

Linoleenzuur (C18:3). Som van de oppervlakken van het methylester en de trans-isomeren van het methylester.

Eïscosenezuur (C20:1)

Beheenzuur (C22:0)

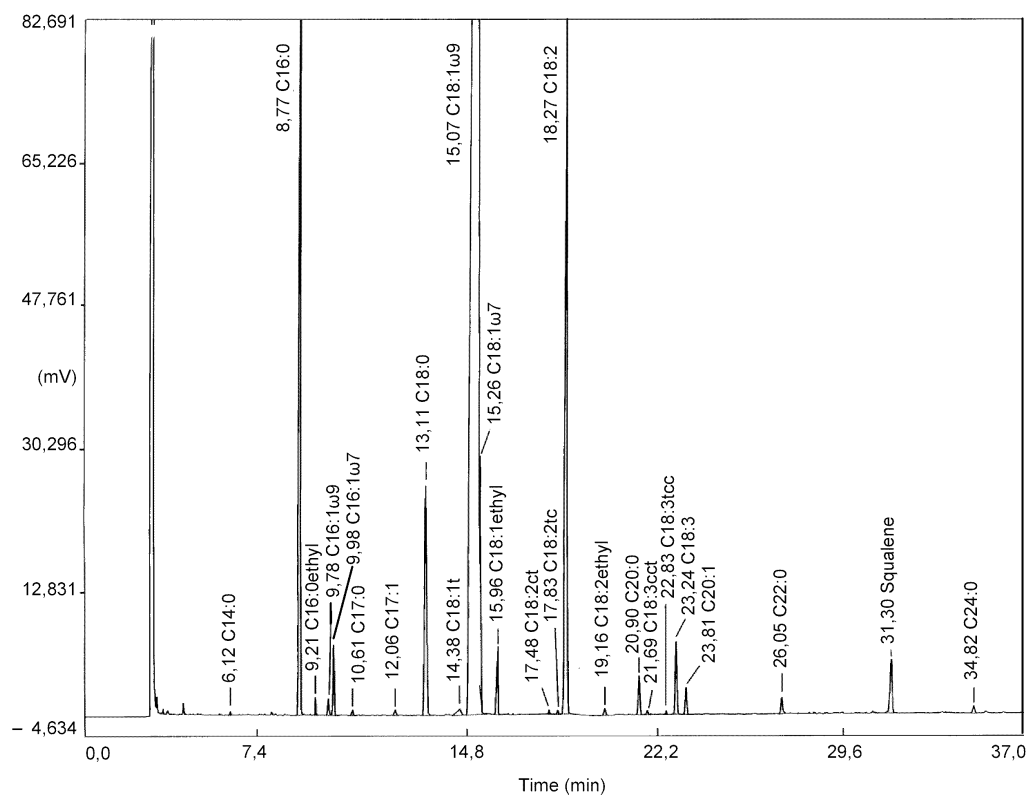
Lignocereenzuur (C24:0).

Voor de berekening van het totale oppervlak heeft met squalen geen rekening te worden gehouden.

- 2.2. Voor de berekening van het percentage trans-C18:1 wordt de piek gebruikt die met de methylesters van dit vetzuur overeenkomt. Voor de som (trans-C18:2 + trans-C18:3) worden alle pieken die overeenkomen met de trans-isomeren van deze twee vetzuren, bij elkaar opgeteld. Om het totale oppervlak te berekenen, wordt met alle pieken die in punt 2.1 worden genoemd (zie COI/T.20/Doc. nr. 17) rekening gehouden.

Voor het berekenen van het percentage van elk vetzuur wordt onderstaande formule toegepast: % X = (oppervlak X × 100)/(totale oppervlak)

▼ M19



Figuur 1: Met behulp van de methode van koude methylering verkregen chromatografisch profiel van een olie uit afvallen van olijven. De chromatografische pieken komen, tenzij anders aangegeven, overeen met de methylesters.



BIJLAGE XI

BEPALING VAN HET GEHALTE AAN GEHALOGENEERDE OPLOSSMIDDELEN1. **BEGINSEL**

Gaschromatografische bepaling met behulp van de head-space techniek.

2. **APPARATUUR**

2.1. Gaschromatograaf, voorzien van een electron capture detector (ECD).

2.2. Instrumentatie voor head-space gaschromatografie.

2.3. Glazen gaschromatografiekolom met een lengte van 2 m en een diameter van 2 mm, stationaire fase.

OV101 10 % gelijkwaardig, op gecalcineerde, met zuur gewassen en gesilaniseerde diatomeeënaarde met korrelgrootte 80—100 Mesh.

2.4. Draaggas en hulpgas: stikstof voor gaschromatografie, geschikt voor electron capture detection.

2.5. Glazen flesjes van 10 tot 15 ml, bekleed met teflon en voorzien van een stop van aluminium met een opening voor het inbrengen van een injectiespuitje.

2.6. Klemmen voor hermetische sluiting.

2.7. Gasinjectiespuitje van 0,5 tot 2 ml.

3. **REAGENTIA**

Standaard: gehalogeneerde oplosmiddelen met een voor gaschromatografie adequate zuiverheidsgraad.

4. **WERKWIJZE**

4.1. Weeg een nauwkeurig bepaalde hoeveelheid van ongeveer 3 g olie af in een glazen flesje (dat achteraf niet meer mag worden gebruikt) en sluit het flesje met de stop hermetisch af. Het flesje bij 70 °C gedurende een uur in één thermostaat plaatsen. Neem uit de gasruimte met de injectiespuit 0,2 tot 0,5 ml op. Injecteer in de kolom van de als volgt ingestelde gaschromatograaf:

— temperatuur injector: 150 °C;

— temperatuur kolom: 70—80 °C;

— temperatuur detector: 200—250 °C.

Eventueel mag op andere temperaturen worden ingesteld, op voorwaarde dat de resultaten gelijkwaardig zijn.

4.2. Referentieoplossingen. Maak standaardoplossingen aan met geraffineerde olijfolie zonder sporen van oplosmiddelen en met verschillende concentraties van gehalogeneerde oplosmiddelen tussen 0,05 en 1 ppm, overeenkomstig het veronderstelde gehalte van het monster. Gebruik pentaan voor eventuele verdunning.

4.3. Kwantitatieve evaluatie. Bepaal de verhouding tussen de oppervlakten of de hoogten van de pieken van het monster en de standaardoplossing waarvan de concentratie verondersteld wordt het dichtst bij die van het monster te liggen. Als de relatieve afwijking groter is dan 10 % moet de analyse worden overgedaan door verrijking met een nieuwe standaardoplossing, en dit totdat de concentratie niet meer dan 10 % afwijkt. Het gehalte wordt bepaald op basis van een gemiddelde van elementaire injecties.

4.4. Weergave van de resultaten. De resultaten worden uitgedrukt in mg/kg (ppm). De detectiegrens van de methode is 0,01 mg/kg.

▼ **M19***BIJLAGE XII***ORGANOLEPTISCHE BEOORDELING VAN OLIJFOLIE VAN EERSTE PERSING**

1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Hierbij worden de criteria vastgesteld voor de beoordeling van de organoleptische kenmerken van bij de eerste persing verkregen olijfolie in de zin van punt 1 van de bijlage bij Verordening nr. 136/66/EEG, en wordt de methode voor de desbetreffende indeling van deze olie aangegeven.

Deze methode geldt slechts voor de indeling van olijfolie van eerste persing uit een oogpunt van fruitigheid en van intensiteit van de gebreken, bepaald door een overeenkomstig punt 4 samengesteld panel van geselecteerde en getrainde proevers.

2. ALGEMEEN

Ten aanzien van de algemene basisterminologie, het proeflokaal, de algemene methodiek en het proefglas is het aan te bevelen de voorschriften van de Internationale Olijfolieraad te volgen.

3. SPECIFIEKE TERMINOLOGIE

3.1. **Positieve kenmerken**

Fruutig: het geheel van rechtstreeks of retronasaal waargenomen reukgevoelwoorden, afhankelijk van de olijfsoort en kenmerkend voor de van verse en gezonde, rijpe of onrijpe, vruchten vervaardigde olie.

Bitter: kenmerkende smaak van olijfolie die uit onrijpe of rijpende olijven is verkregen.

Scherp: prikkelend gevoel in de mond, kenmerkend voor aan het begin van het seizoen en hoofdzakelijk uit nog onrijpe olijven verkregen olie.

3.2. **Negatieve kenmerken**

Olijfengisting: flavour die kenmerkend is voor olie uit in hopen opgeslagen olijven waarvan de anaerobe gisting ver gevorderd is.

Schimmel — vochtigheid: flavour die kenmerkend is voor olie uit olijven waarop schimmels zijn gegroeid doordat de vruchten enkele dagen bij vochtige omstandigheden zijn opgeslagen.

Droesem: flavour die kenmerkend is voor olie die in contact is gebleven met het bezinksel in de tanks en bakken.

Wijnachtig — azijn: flavour die kenmerkend is voor sommige oliën die doen denken aan wijn of azijn. Deze gewaarwording is hoofdzakelijk te wijten aan de gisting van de olijven waardoor azijnzuur, ethylacetaat en ethanol ontstaan.

Metaal: flavour die doet denken aan metaal. Zij is kenmerkend voor olie die tijdens het malen, het persen of de opslag lang in contact is geweest met metalen oppervlakken.

Ranzig: flavour van oliën die oxidatie hebben ondergaan.

Gekookt of verbrand: flavour die kenmerkend is voor olie die wordt veroorzaakt door te sterke en/of te lange verhitting tijdens de productie en met name bij het mengen van de massa olijvenvruchtvlies met ondeugdelijke verhitting.

Hooi — hout: flavour die kenmerkend is voor oliën uit droge olijven.

Robuust: gewaarwording die kenmerkend is voor sommige oliën die bij het proeven in de mond een gevoel van dichtheid en kleverigheid veroorzaken.

Smeermiddelen: flavour van olijfolie, die doet denken aan stookolie, vet of minerale olie.

Vruchtwater: flavour die te wijten is aan langdurig contact met vruchtwater.

Pekel: flavour van olie uit olijven die zijn bewaard in pekelen.

Esparto: flavour die kenmerkend is voor olie die is verkregen uit olijven die zijn geperst in nieuwe persmanden van esparto. De gewaarwording

▼ **M19**

kan verschillen naargelang de persmanden van ongedroogd of gedroogd esparto zijn gemaakt.

Grond: flavour van olie uit olijven waaraan grond of modder zat en die niet zijn gewassen.

Wormstekig: flavour van olie uit olijven die zijn aangetast door larven van de olijfvlieg (*Bactrocera oleae*).

Komkommer: flavour van olie die kenmerkend is voor te lange hermetische bewaring, met name in blikken, en die wordt toegeschreven aan het ontstaan van 2-6 nonadienal.

4. **PANEL**

Het panel wordt door de lidstaat aangewezen en bestaat uit een voorzitter en acht tot twaalf proevers. Voor het verkoopseizoen 2001/2002 mag het panel echter minder dan acht proevers tellen.

De voorzitter van het panel moet degelijk zijn opgeleid en een ervaren expert voor de verschillende soorten olijfolie zijn. Hij is verantwoordelijk voor het panel, voor de organisatie en het functioneren ervan en hij is belast met de voorbereidingen, de codering van de monsters en de aanbieding ervan aan de proevers, alsmede met het verzamelen en de statistische verwerking van de gegevens.

De voorzitter van het panel selecteert de proevers en zorgt voor hun training en de controle van hun werk zodat zij een hoog bekwaamheidsniveau kunnen aanhouden.

De panelleden bij organoleptische tests van olijfolie moeten geselecteerd en getraind zijn op grond van hun vermogen om soortgelijke monsters van elkaar te onderscheiden, overeenkomstig de handleiding van de Internationale Olijfolieraad voor de selectie, de opleiding en de controle van gekwalificeerde proevers van olijfolie van de eerste persing.

De panels moeten zich ertoe verbinden deel te nemen aan organoleptische beoordelingen op nationaal, communautair of internationaal niveau voor de periodieke controle en de harmonisering van de perceptiecriteria. Voorts moeten zij de betrokken lidstaat jaarlijks in kennis stellen van alle gegevens over de samenstelling van het panel en het aantal beoordelingen die zij als erkend panel hebben uitgevoerd.

5. **PROCEDURE VOOR DE ORGANOLEPTISCHE BEOORDELING EN DE INDELING**5.1. **Gebruik van het beoordelingsformulier door het panellid**

Het door het panellid te gebruiken beoordelingsformulier is opgenomen in aanhangsel A.

Elke proever die deel uitmaakt van het panel, moet aan de in een proefglas aangeboden olie ruiken en die vervolgens proeven⁽¹⁾ om de reuk, de smaak, het mondgevoel en de kinesthetische kenmerken te analyseren. Vervolgens moet hij op het beoordelingsformulier de intensiteit vermelden waarmee hij de negatieve en positieve kenmerken gewaarwordt.

Wanneer negatieve kenmerken worden waargenomen die niet op het formulier voorkomen, moeten die worden aangegeven in de rubriek „Andere” met de in punt 3.2 van deze bijlage omschreven termen die de gewaarwording het best weergeven.

5.2. **Verwerking van de gegevens door de voorzitter van het panel**

De voorzitter van het panel moet de door de panelleden ingevulde beoordelingsformulieren inzamelen; hij moet de voor elk kenmerk vermelde intensiteit controleren. Wanneer hij een anomalie constateert, vraagt hij het betrokken panellid zijn beoordelingsformulier te herzien en eventueel de test over te doen.

De voorzitter van het panel kan de door elk panellid vermelde gegevens verwerken in een programma dat gebruikmaakt van de in aanhangsel B beschreven methode voor de berekening van de statistische mediaan. De gegevens van een monster moeten worden ingevoerd aan de hand van een

⁽¹⁾ Het panellid hoeft niet te proeven wanneer een uiterst onaangenaam kenmerk wordt waargenomen; hij moet deze uitzonderlijke situatie in het beoordelingsformulier vermelden.

▼ M19

rooster met tien kolommen voor de tien kenmerken en met zoveel regels als er panelleden zijn.

Wanneer in de rubriek „Andere” door minstens de helft van de panelleden een negatief kenmerk is vermeld, moet de voorzitter van het panel voor dit kenmerk de mediaan berekenen en de olie in de corresponderende categorie indelen.

Wanneer tests worden verricht om na te gaan of de normen in acht zijn genomen of in het kader van tegenexpertises, moet de voorzitter van het panel driemaal een organoleptische beoordeling van de olie laten uitvoeren met een tussenpoos van ten minste één dag na elke test; de mediaan van de kenmerken wordt dan berekend op basis van de gegevens in de beoordelingsformulieren van de drie tests.

5.3. Indeling van de oliën

De olie wordt ingedeeld bij één van de onderstaande categorieën naar gelang van de mediaan voor de gebreken en de mediaan voor het kenmerk fruitig. Onder mediaan voor de gebreken wordt verstaan de mediaan voor het negatieve kenmerk dat is waargenomen met de grootste intensiteit. De robuuste variatiecoëfficiënt voor dat gebrek mag niet hoger zijn dan 20 %.

- a) *Extra olijfolie van de eerste persing*: de mediaan voor de gebreken is gelijk aan 0 en de mediaan voor de fruitigheid is hoger dan 0.
- b) *Olijfolie van de eerste persing*: de mediaan voor de gebreken is hoger dan 0, maar niet hoger dan 2,5 en de mediaan voor de fruitigheid is hoger dan 0.
- c) *Courante olijfolie van de eerste persing*: de mediaan voor de gebreken is hoger dan 2,5, maar niet hoger dan 6,0; of de mediaan voor de gebreken is niet hoger dan 2,5 en de mediaan voor fruitigheid is gelijk aan 0.
- d) *Olijfolie van de eerste persing voor verlichting*: de mediaan voor de gebreken is hoger dan 6,0.

Met ingang van 1 november 2003 worden de categorieën c) en d) echter vervangen door de categorie:

- c) *Olijfolie voor verlichting*: de mediaan voor de gebreken is hoger dan 2,5; of de mediaan voor de gebreken is niet hoger dan 2,5 en de mediaan voor fruitigheid is gelijk aan 0.

5.4. Bijzondere gevallen

Wanneer de mediaan voor een ander positief kenmerk dan „fruitig” hoger is dan 5,0, moet de voorzitter van het panel dit op het beoordelingsformulier vermelden.

▼ **M19***AANHANGSEL A***Beoordelingsformulier**

(voor het panellid)

GEWAARWORDING VAN DE
GEBREKEN

INTENSITEIT

Olijvengisting	----->
Schimmel — Vochtigheid	----->
Wijnachtig — azijn	----->
Droemsem	----->
Metaal	----->
Ranzig	----->
Andere (omschrijven)	----->

GEWAARWORDING VAN DE POSITIEVE KENMERKEN

Fruitig	----->
Bitter	----->
Scherp	----->

Naam van het panellidCode van het monsterDatum

▼ **M19***AANHANGSEL B***METHODE VOOR DE BEREKENING VAN DE MEDIAAN EN DE BETROUWBAARHEIDSINTERVALLEN****Mediaan**

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

De mediaan is het reële getal X_m gekenmerkt door het feit dat de kans (P) dat de waarden van de verdeling (X) lager liggen dan dat getal (X_m), kleiner is dan of gelijk is aan 0,5 en dat tegelijkertijd de kans (P) dat de waarden van de verdeling (X) kleiner zijn dan of gelijk zijn aan X_m , groter is dan of gelijk is aan 0,5. Volgens een andere definitie is de mediaan het 50e percentiel van een naar opklimmende grootte gerangschikte reeks getallen. De mediaan is met andere woorden de middelste waarde van een gerangschikte reeks oneven getallen of het gemiddelde van de twee middelste waarden van een gerangschikte reeks even getallen.

Robuuste standaardafwijking

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

Om de variabiliteit rond de mediaan op betrouwbare wijze te kunnen schatten, moet de robuuste standaardafwijking volgens het model van Stuart en Kendall worden geschat. De asymptotische standaardafwijking S wordt bepaald door N en IQR. N is het aantal waarnemingen en IQR de interkwartielafstand, d.w.z. de robuuste schatting van de variabiliteit van de betrokken gegevens (de interkwartielafstand omvat precies 50 % van de gevallen van ongeacht welke waarschijnlijkheidsverdeling). De intervalafstand wordt berekend op basis van de afstand tussen het 75e en 25e percentiel.

IQR = 75° percentiel — 25° percentiel

Het percentiel is de waarde X_{pc} gekenmerkt door het feit dat de kans (P) dat de waarden van de verdeling lager liggen dan X_{pc} , kleiner is dan of gelijk is aan een bepaald honderdste en dat tegelijkertijd de kans (P) dat de waarden van de verdeling kleiner zijn dan of gelijk zijn aan X_{pc} , groter is dan of gelijk is aan het genoemde honderdste. Het honderdste geeft het in aanmerking genomen gedeelte van de verdeling weer. In het geval van de mediaan betreft het 50/100.

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

Het percentiel is met andere woorden de verdelingswaarde die overeenstemt met een bepaald oppervlak dat wordt begrensd door de verdelings- of dichtheidskromme. Zo is het 25e percentiel de verdelingswaarde die overeenstemt met een oppervlak van 0,25 of 25/100.

Robuuste variatiecoëfficiënt

$$RVC = \frac{S}{Me} 100$$

RVC is een natuurlijk getal, d.w.z. zonder exponent, dat het percentage weergeeft van de variabiliteit van de onderzochte getallenreeks ten opzichte van de waarde Me van de mediaan; daarom is deze coëfficiënt zeer nuttig bij het beoordelen van de betrouwbaarheid van de panelleden.

▼ M19**Betrouwbaarheidsinterval van 95 % voor de mediaan**

Het betrouwbaarheidsinterval (B.I.) van 95 % (foutenmarge van de eerste soort gelijk aan 0,05 of 5 %) is de marge waarbinnen de mediaan zou kunnen variëren wanneer de test een oneindig aantal keren zou worden herhaald. In de praktijk geeft dat interval de variabiliteit van de test aan in de vastgestelde omstandigheden wanneer de test een oneindig aantal keren zou worden herhaald. Het interval draagt, evenals de RVC, bij tot de beoordeling van de betrouwbaarheid van de test.

$B.I. S \text{ sup.} = Me + (c.S)$
 $B.I. S \text{ inf.} = Me - (c.S)$ waarbij c , in het geval van het betrouwbaarheidsinterval 0,95, 1,96 bedraagt.

De oliën worden ingedeeld door de waarden van de mediaan te vergelijken met de in punt 5.3 van de bijlage vastgestelde referentie-intervallen. Met de programmatuur kan de indeling visueel worden voorgesteld in de vorm van een tabel met statistische gegevens of in de vorm van een grafiek.

▼B

BIJLAGE XIII

▼M6**NEUTRALISERING EN ONTKLEURING VAN OLIJFOLIE IN HET LABORATORIUM****▼B**

1. NEUTRALISERING EN ONTKLEURING VAN OLIJFOLIE IN HET LABORATORIUM

1.1. Neutralisering van de olijfolie

1.1.1. Apparatuur

- hoog bekeerglas van 300 ml;
- laboratoriumcentrifuge met buisjes van 100 ml;
- bekeerglas van 250 ml;
- kolven van 100 ml;
- scheidtrechter van 1 liter.

1.1.2. Reagentia

- natriumhydroxyde, oplossing van 12 % in water;
- fenoltaleïne, oplossing van 1 % in ethanol;
- hexaan, p.a.
- isopropylalcohol, p.a.

1.1.3. Werkwijze

- a) *Oliën met een gehalte aan vrije vetzuren beneden 30 %, berekend als oliezuur*

Breng in een hoog bekeerglas van 300 ml, 50 g ruwe olie en verwarm in een waterbad tot 65 °C. Voeg onder langzaam roeren een zodanige hoeveelheid natriumhydroxydeoplossing (12 %) toe als overeenkomt met het gehalte aan vrije vetzuren van de olie, met een overmaat van 5 %. Blijf gedurende 5 minuten roeren en houd de temperatuur op 65 °C.

Breng alles over in centrifugebuisjes van 100 ml en centrifugeer de zeepasta af. Giet de geklaarde olie af in een bekeerglas van 250 ml en was met 50—60 ml kokend gedestilleerd water. Verwijder de waterlaag met behulp van een hevel. Herhaal het wassen tot alle overblijvende sporen van zeep zijn verdwenen (tot de fenoltaleïne niet meer rose kleurt). Centrifugeer de olie af om de kleine resten water te verwijderen.

- b) *Oliën met een gehalte aan vrije vetzuren boven 30 %, berekend als oliezuur*

Breng in een scheidtrechter van 1 liter 50 g ruwe olie, 200 ml hexaan, 100 ml isopropylalcohol en een zodanige hoeveelheid natriumhydroxydeoplossing (12 %) als overeenkomt met het gehalte aan vrije vetzuren van de olie, met een overmaat van 0,3 %. Roer flink gedurende een minuut, voeg 100 ml gedestilleerd water toe, roer nogmaals en laat staan. Na scheiding van de lagen de zeephoudende onderlaag lagen wegvloeien. Tussen de twee lagen (olie boven en waterige laag onder) ontstaat vaak een tussenlaag, bestaande uit slijmige en niet oplosbare stoffen, die eveneens moet worden verwijderd. Was vervolgens de hexaanoplossing van neutrale olie met porties van 50—60 ml van een oplossing van een volumedeel isopropylalcohol in een volumedeel gedestilleerd water tot de fenoltaleïne geen rose kleuring meer geeft.

Verwijder vervolgens het hexaan volledig door destillatie onder vacuüm (bij voorbeeld door middel van een roterende verdamper).

1.2. Ontkleuring van de genutraliseerde olie

1.2.1. Apparatuur

- kolf van 250 ml met drie ingeslepen halzen voor het inbrengen van:
 - a) een thermometer ingedeeld in °C en geschikt voor aflezingen tot 90 °C;
 - b) een mechanische roerder met een toerental van 250—300 omw/min en voorzien van een inrichting voor bedrijf onder vacuüm;

▼B

- c) een aansluiting voor de vacuümpomp;
- vacuümpomp, in staat een resterende druk te geven van 15—30 mbar, en voorzien van een manometer.

1.2.2 Werkwijze

Weeg in de driehalskolf ca. 100 g van de geneutraliseerde olijfolie af. Breng de thermometer en de roerder aan; sluit de vacuümpomp aan en verwarm onder roeren tot 90 °C, houd onder voortdurend roeren deze temperatuur aan totdat de te analyseren olie volledig watervrij is (ongeveer 30 minuten).

Zet de vacuümpomp af en voeg 2 tot 3 g geactiveerde bleekarde toe. Breng het vacuüm opnieuw tot stand tot een resterende druk van 15—30 mbar en roer steeds bij een temperatuur van 90 °C gedurende 30 minuten bij 250 omw/min.

Filtreer vervolgens warm in een oven met thermostaat (50—60 °C).

▼M19

▼B*BIJLAGE XV***1. BEPALINGEN VAN HET OLIEGEHALTE VAN DE AFVALLEN VAN OLIJVEN****1.1. Toestellen**

Geschikt extractietoestel; inhoud van de kolf 200 à 250 ml.

Bad met elektrische verwarming (zandbad, waterbad, enz.) op verwarmingsplaat.

Analystische balans.

Droogoven, ingesteld op maximaal 80 °C.

Elektrische droogstoof, voorzien van een temperatuurregelaar en de mogelijkheid om lucht in te blazen of een gereduceerde druk te bewerkstelligen, ingesteld op 103 °C ± 2 °C.

Machinale molen, die gemakkelijk kan worden gereinigd en waarmede men in staat is te malen zonder dat het materiaal warm wordt en zonder dat het vocht- en oliegehalte van het gemalen produkt verminderen.

Mortier en stamper van porselein, ijzer of brons of bij voorkeur geschikt machinaal fijnmaaltoestel.

Extractiehuls en watten of filtreerpapier, vrij van in n-hexaan oplosbare stoffen.

Exsiccator.

Zeef met gaten 1 mm doorsnede.

Puimsteen in kleine korrels, vooraf gedroogd.

1.2. Reagentia

n-Hexaan technisch, waarvan het residu bij volledige verdamping minder bedraagt dan 0,002 g/100 ml.

2. WERKWIJZE**2.1. Bereiding van het analysemonster**

Maal het analysemonster indien nodig in het vooraf goed gereinigd maaltoestel. Verwijder daartoe het eerste maalsel (ongeveer 1/20 deel van het analysemonster) en maal de rest zodanig dat deeltjes worden verkregen die volledig door de zeef gaan. Meng zorgvuldig en analyseer onmiddellijk.

2.2. Monsterweging

Weeg onmiddellijk na het malen tot op 0,01 g nauwkeurig ongeveer 10 g van het analysemonster af.

2.3. Gereedmaken van de extractiehuls

Breng de proefeenheid in de huls en sluit deze met een watje af.

Pak, indien filtreerpapier wordt gebruikt, de proefeenheid in dit papier.

2.4. Voordrogen

Plaats wanneer het monster zeer vochtig is (gehalte aan water en vluchtige bestanddelen, vochtgehalte meer dan 10 %) de gevulde huls of het in filtreerpapier verpakte monster enige tijd in de tot maximaal 80 °C verwarmde stoof om het vochtgehalte tot minder dan 10 % terug te brengen.

2.5. Gereedmaken van de kolf

Weeg tot op 0,001 g nauwkeurig een kolf die 1 à 2 korrels puimsteen bevat en die tevoren is gedroogd bij een temperatuur van 103 ± 2 °C en gedurende ten minste een uur in een exsiccator is afgekoeld.

▼B**2.6. Eerste extractie**

Plaats de huls of het in filtreerpapier verpakte monster in het extractietoestel, giet in de kolf de benodigde hoeveelheid hexaan. Bevestig de kolf aan het extractietoestel en plaats het geheel op het elektrische verwarmingsbad.

Verwarm zodanig dat de terugvloeï ten minste 3 druppels/seconde bedraagt (matig, niet heftig koken).

Extraheer gedurende 4 uur.

Laat het geheel afkoelen.

Neem de huls uit het extractietoestel en plaats haar in een luchtstroom ter verwijdering van het grootste deel van het oplosmiddel waarmee de huls is doordrenkt.

2.7. Tweede extractie

Ledig de huls in de mortier en maak het geheel zo fijn mogelijk. Breng het mengsel weer kwantitatief in de huls en plaats de huls in het extractietoestel en zet de extractie nog twee uur voort, met gebruikmaking van dezelfde kolf die het eerste extract bevat. De in de extractiekolf verkregen oplossing dient helder te zijn.

Filtreer indien dit niet het geval is de oplossing over een filtreerpapier. Was de kolf en het filtreerpapier meerdere malen met hexaan uit.

Verzamel het filtraat en het voor het wassen gebruikt oplosmiddel in een tweede kolf, die vooraf werd gedroogd en gewogen op 0,001 g nauwkeurig.

2.8. Verwijdering van het oplosmiddel en weging van het extract

Verwijder het grootste deel van het oplosmiddel uit de kolf door afdistilleren op een elektrisch verwarmingsbad.

Verwijder de laatste sporen oplosmiddel door verhitting van de kolf gedurende 20 minuten bij een temperatuur van 103 ± 2 °C.

Vergemakkelijk deze verwijdering, hetzij door van tijd tot tijd lucht of bij voorkeur een inert gas in te blazen, hetzij door onder verminderde druk te werken. Laat de kolf gedurende ten minste 1 uur in een exsiccator afkoelen en weeg tot op 0,001 g nauwkeurig.

Verwarm opnieuw gedurende 10 minuten onder dezelfde omstandigheden, laat afkoelen in een exsiccator en weeg.

Het verschil tussen deze beide wegingen mag niet groter zijn dan 0,010 g; anders dient opnieuw steeds gedurende 10 minuten te worden verwarmd gevolgd door afkoelen en wegen totdat het gewichtsverschil ten hoogste 0,010 g bedraagt.

Noteer het resultaat van de laatste weging van de kolf.

Verricht twee bepalingen op hetzelfde analysemonster.

3. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN**3.1. Berekeningswijze en formule**

- a) Bereken het oliegehalte in gewichtspercenten van het onbehandelde produkt met de formule:

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

waarin:

S = gehalte aan olie in massaprocenten van het onbehandelde produkt;

m_0 = massa, in grammen van de proefeenheid;

m_1 = massa, in grammen van de olie die bij de laatste weging in de kolf is gevonden.

Indien aan de eisen inzake de reproduceerbaarheid is voldaan, neemt men als resultaat het rekenkundig gemiddelde van de twee bepalingen.

Druk de resultaten uit met één decimaal.

- b) Op verzoek kan het oliegehalte worden uitgedrukt ten opzichte van de droge stof en berekend met de formule:

▼B

$$\text{olie in massaprocenten van de droge stof} = S \times \frac{100}{100 - U}$$

waarin:

S = gehalte aan olie in massaprocenten van het onbehandelde product (zie a);

U = vochtgehalte in %.

3.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen die door dezelfde analist gelijktijdig en snel na elkaar worden verricht mag niet meer bedragen dan 0,2 g voor het met behulp van hexaan verkregen extract uit 100 g monster.

Indien dit niet het geval is, moet de bepaling worden herhaald met twee andere analysemonsters.

Neem, indien ditmaal het verschil nog groter is dan 0,2 g, als resultaat het rekenkundig gemiddelde van de vier verrichte bepalingen.



BIJLAGE XVI

BEPALING VAN HET JOODGETAL

1. DOEL

Deze internationale norm beschrijft een methode voor de bepaling van het joodgetal van dierlijke en plantaardige oliën en vetten, hierna te noemen vetstoffen.

2. DEFINITIE

In het kader van deze internationale norm geldt de volgende definitie:

- 2.1. Joodgetal: de hoeveelheid jodium die door het analysemonster wordt opgenomen onder de omstandigheden die in deze internationale norm zijn gespecificeerd.

Het joodgetal wordt uitgedrukt in grammen jodium per 100 g analysemonster.

3. PRINCIPE

Een analyseportie wordt opgelost in een oplosmiddel, waarna Wijs-reagens wordt toegevoegd. Na een bepaalde tijd worden een kaliumjodideoplossing en water toegevoegd en vervolgens wordt het vrijgemaakte jodide getitreerd met natriumthiosulfaatoplossing.

4. REAGENTIA

Alle reagentia dienen van analysekwaliteit te zijn.

- 4.1. Water, dat voldoet aan de eisen van ISO 3896, kwaliteit 3.

- 4.2. Kaliumjodideoplossing, 100 g/l, zonder vrij jodium of jodaat.

- 4.3. Zetmeeloplossing

Meng 5 g oplosbaar zetmeel met 30 ml water, en voeg dit mengsel toe aan 1 000 ml kokend water; laat 3 minuten koken en laat afkoelen.

- 4.4. Volumetrische gestandaardiseerde natriumthiosulfaatoplossing $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$ die niet ouder is dan 7 dagen.

- 4.5. Oplosmiddel, bereid door menging van gelijke volumes cyclohexaan en azijnzuur.

- 4.6. Wijs-reagens met joodmonochloride in azijnzuur. Er dient in de handel verkrijgbaar Wijs-reagens te worden gebruikt.

Opmerking: De reagens bevat 9 g ICl_3 + 9 g I in azijnzuur.

5. APPARATUUR

Normale laboratoriumapparatuur en in het bijzonder:

- 5.1. Glazen weegschaaltjes die geschikt zijn voor de analyseportie en die in de Erlenmeyers (5.2) kunnen worden gebracht.

- 5.2. Erlenmeyers van 500 ml, met ingeslepen glazen stop en volledig droog.

6. BEREIDING VAN HET ANALYSEMONSTER

Droog het gehomogeniseerde monster op natriumsulfaat en filtreer.

7. WERKWIJZE

7.1. Analyseportie

De analyseportie heeft, naar gelang van het verwachte joodgetal, de in tabel 1 vermelde grootte.

▼B

Tabel 1

Verwacht joodgetal	Grootte analyseportie
Kleiner dan 5	3,00 g
5 t/m 20	1,00 g
21 t/m 50	0,40 g
51 t/m 100	0,20 g
101 t/m 150	0,13 g
151 t/m 200	0,10 g

Weeg de analyseportie in een glazen weegschaaltje (6.1) af op 0,1 mg nauwkeurig.

7.2. Bepaling

Breng de analyseportie in een Erlenmeyer (5.2) van 500 ml. Voeg 20 ml van het oplosmiddel (4.5) toe om de vetstof op te lossen. Voeg exact 25 ml van het Wijs-reagens (4.6) toe, sluit de kolf af, schud met een draaiende beweging en plaats de Erlenmeyer in het donker. Gebruik geen mondpipet voor het Wijs-reagens.

Bereid op dezelfde wijze een blanco met het oplosmiddel en de reagens, maar zonder de analyseportie.

Laat de Erlenmeyers voor monsters met een joodgetal van minder dan 150 gedurende 1 uur in het donker staan; laat de Erlenmeyers voor monsters met een joodgetal boven 150 en voor gepolymeriseerde producten of producten die in aanzienlijke mate zijn geoxideerd, gedurende 2 uur in het donker staan.

Voeg na afloop van die periode 20 ml van de kaliumjodideoplossing (4.2) en 150 ml water (4.1) toe in elk van de Erlenmeyers.

Titreer met de volumetrische gestandaardiseerde natriumthiosulfaatoplossing (4.4) totdat de gele kleur als gevolg van het jodium vrijwel is verdwenen. Voeg enkele druppels van de zetmeeloplossing (4.3) toe en ga verder met het titreren totdat de blauwe kleur verdwijnt na heftig schudden.

Opmerking: Potentiometrische bepaling van het eindpunt is toegestaan.

7.3. Aantal bepalingen

Voer twee bepalingen uit op hetzelfde analysemonster.

8. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Het joodgetal is

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

waarin:

c = de concentratie in mol per liter van de gebruikte volumetrische gestandaardiseerde natriumthiosulfaatoplossing (4.4);

V₁ = het volume, in ml, van de volumetrische gestandaardiseerde natriumthiosulfaatoplossing (4.4) dat is gebruikt voor de blanco;

V₂ = het volume, in ml, van de volumetrische gestandaardiseerde natriumthiosulfaatoplossing (4.4) dat is gebruikt voor de bepaling;

m = de hoeveelheid, in grammen, van de analyseportie (7.1).

Neem als resultaat het rekenkundig gemiddelde van de twee bepalingen, voor zover aan de eis inzake herhaalbaarheid is voldaan.

▼ **M11***BIJLAGE XVII***METHODE VOOR DE BEPALING VAN STIGMASTADIËNEN IN PLANTAARDIGE OLIËN**

1. DOEL

Bepaling van stigmastadiënen in plantaardige oliën met lage concentraties van deze koolwaterstoffen, met name in olijfolie verkregen bij de eerste persing en olie uit afvallen van olijven.

2. TOEPASSINGSGEBIED

Deze norm kan worden gebruikt voor alle plantaardige oliën, hoewel de metingen alleen betrouwbaar zijn wanneer het gehalte aan deze koolwaterstoffen tussen 0,01 en 4,0 mg/kg ligt. De methode is vooral geschikt om te bepalen of olijfolie verkregen bij de eerste persing, geraffineerde plantaardige oliën (olijfolie, olie uit afvallen van olijven, zonnebloemolie, palmolie, enz.) bevat, aangezien geraffineerde olie stigmastadiënen bevat en olie verkregen bij de eerste persing niet.

3. PRINCIPE

Bereiding van het onverzeepbare residu. De steroïd-koolwaterstoffractie wordt geïsoleerd met behulp van kolomchromatografie over silicagel en geanalyseerd met behulp van capillaire gaschromatografie.

4. APPARATUUR

4.1. Kolven, 250 ml, met refluxkoeler.

4.2. Scheitrechters, 500 ml.

4.3. Rondbodemkolven, 100 ml.

4.4. Rotatieverdamer.

4.5. Glazen chromatografiekolom (inwendige diameter 1,5-2,0 cm en lengte 50 cm) met een teflon kraan en een pluk glaswol of een schijf gesinterd glas op de bodem. Schenk voor de bereiding van de chromatografiekolom een laag van ongeveer 5 cm hexaan in de kolom en voeg vervolgens in porties een slurry van silicagel in hexaan toe (15 g in 40 ml). Laat de kolom eerst spontaan en vervolgens door licht te vibreren uitzakken. Voeg watervrij natriumsulfaat toe totdat het vloeistofpeil ongeveer 0,5 cm is gestegen en elueer ten slotte de overmaat van hexaan.

4.6. Gaschromatograaf met vlamionisatiedetector, splitinjector of koude kolominjector en een met een nauwkeurigheid van ± 1 °C programmeerbare oven.

4.7. Fused-silica capillaire kolom voor gaschromatografie (inwendige diameter 0,25 of 0,32 mm, lengte 25 m), inwendig gecoat met een 5 % fenylmethylsilicon-fase met een laagdikte van 0,25 μm .

NB 1

Ook andere kolommen met een soortgelijke of lagere polariteit kunnen worden gebruikt.

4.8. Integreerende recorder met een instelling voor dal/dal-integratie.

4.9. Micro-injectiespuit voor gaschromatografie, 5-10 μl , met geharde naald.

4.10. Elektrische verwarmingsmantel of -plaat.

5. REAGENTIA

Alle reagentia moeten p.a. zijn, tenzij een andere specificatie wordt gegeven. Het gebruikte water moet gedestilleerd zijn of minimaal dezelfde zuiverheidsgraad hebben.

5.1. Hexaan of een mengsel van alkanen met een kooktraject van 65-70 °C, gedestilleerd met een fractioneerkolom.

NB 2

Het oplosmiddel moet worden gedestilleerd om verontreinigingen te verwijderen.

5.2. Ethanol, 96 % (v/v).

▼ **M11**

- 5.3. Natriumsulfaat, watervrij.
- 5.4. Alcoholische kaliumhydroxideoplossing, 10 %: voeg 10 ml water toe aan 50 g kaliumhydroxide, roer en los vervolgens het mengsel op in ethanol (aanvullen tot 500 ml).

NB 3

Deze oplossing wordt na verloop van tijd bruin en moet dan ook elke dag vers worden bereid en in een goed afgesloten fles van donker glas worden bewaard.

- 5.5. Silicagel 60 voor kolomchromatografie, 70-230 mesh (Merck ref. nr. 7734 of soortgelijk).

NB 4

Meestal kan silicagel zonder behandeling rechtstreeks uit de verpakking worden gebruikt. Sommige partijen kunnen echter een lage activiteit hebben, hetgeen leidt tot slechte chromatografische scheidingen. In dat geval moet de silicagel als volgt worden behandeld: activeer de silicagel door deze gedurende minimaal vier uur op 550 °C te verhitten. Laat daarna de silicagel in een exsiccator afkoelen en breng deze vervolgens over in een gesloten fles. Voeg 2 % water toe en schud tot er geen klonten meer zichtbaar zijn en het poeder vrij stroomt. Als een partij silicagel chromatogrammen met overlappende pieken oplevert, moet de silicagel op dezelfde manier worden behandeld. Het is ook mogelijk extra zuivere silicagel 60 te gebruiken (Merck, ref. nr. 7754).

- 5.6. Voorraadoplossing (200 ppm) cholesta-3,5-dieen (Sigma, 99 % zuiver) in hexaan (10 mg in 50 ml).
- 5.7. Standaardoplossing: 20 ppm cholesta-3,5-dieen in hexaan, verkregen door verdunning van bovengenoemde oplossing.

NB 5

Indien de oplossingen in de punten 5.6 en 5.7 bij minder dan 4 °C worden bewaard, blijven zij minimaal vier maanden goed.

- 5.8. Oplossing de n-nonacosaan in hexaan (ongeveer 100 ppm).
- 5.9. Draaggas voor chromatografie: helium of waterstof, zuiverheid 99,9990 %.
- 5.10. Hulpgasen voor de vlamionisatiedetector: waterstof, zuiverheid 99,9990, en gezuiverde lucht.

6. WERKWIJZE

6.1. **Bereiding van het onverzeebare residu.**

- 6.1.1. Weeg $20 \pm 0,1$ g olie af in een kolf van 250 ml (punt 4.1), voeg 1 ml standaardoplossing cholesta-3,5-dieen (20 µg) en 75 ml alcoholische kaliumhydroxideoplossing, 10 %, toe, bevestig de refluxkoeler en laat de oplossing gedurende 30 minuten zachtjes koken. Stop met verwarmen en laat de oplossing enigszins afkoelen (laat niet helemaal afkoelen, aangezien het monster dan gaat stollen). Voeg 100 ml water toe en breng de oplossing met behulp van 100 ml hexaan over in een scheidrecter (punt 4.2). Schud het mengsel krachtig gedurende 30 seconden en laat het vervolgens uitzakken.

NB 6

Voeg, indien een emulsie ontstaat die niet snel verdwijnt, kleine hoeveelheden ethanol toe.

- 6.1.2. Breng de waterige onderlaag over in een tweede scheidrecter en extraheer opnieuw met 100 ml hexaan. Tap opnieuw de onderlaag af en was de hexaanextracten (samengevoegd in een andere scheidrecter) drie keer met telkens 100 ml van een ethanol/watermengsel (1 : 1) tot een neutrale pH wordt bereikt.
- 6.1.3. Droog de hexaanoplossing over watervrij natriumsulfaat (50 g), was met 20 ml hexaan en damp de oplossing droog in een rotatieverdamer bij 30 °C en lage druk.

6.2. **Isolatie van de steroid-koolwaterstoffractie.**

- 6.2.1. Breng het residu op de fractioneer kolom met behulp van twee porties hexaan van 1 ml. Laat het monster in de kolom zakken door het niveau van de oplossing te laten dalen tot de bovenkant van de natriumsulfaatlaag. Begin de elutie met hexaan met een stroomsnelheid van ongeveer

▼ **M11**

1 ml/min. Gooi de eerste 25-30 ml eluaat weg en vang de volgende 40 ml op. Breng deze fractie vervolgens over in een rondbodemkolf van 100 ml (punt 4.3).

NB 7

De eerste fractie bevat verzadigde koolwaterstoffen (zie figuur 1a) en de tweede fractie de steroid-koolwaterstoffen. Bij verdere elutie verschijnen squaleen- en soortgelijke verbindingen. Om een goede scheiding tussen de verzadigde en de steroid-koolwaterstoffen te krijgen moeten de fractievolumes worden geoptimaliseerd. Hiertoe moet het volume van de eerste fractie zodanig worden aangepast dat bij analyse van de tweede fractie de pieken van de verzadigde koolwaterstoffen (zie figuur 1c) laag zijn. Als deze pieken niet verschijnen, maar de piek van de standaard laag is, moet het volume worden verlaagd. Een volledige scheiding tussen de componenten van de eerste en de tweede fractie is overigens niet nodig, aangezien de pieken elkaar bij gaschromatografie niet overlappen als de bij punt 6.3.1 vermelde werkomstandigheden worden gehanteerd.

Meestal hoeft het volume van de tweede fractie niet te worden geoptimaliseerd, aangezien er een goede scheiding is met de verbindingen die later elueren. Een grote piek bij een retentietijd van ongeveer 1,5 min. lager dan de standaard, wordt echter veroorzaakt door squaleen en wijst op een slechte scheiding.

- 6.2.2. Damp de tweede fractie bij 30 °C en verlaagde druk in de rotatieverdampers droog. Neem het residu onmiddellijk op in 0,2 ml hexaan en bewaar de oplossing in de koelkast tot deze geanalyseerd wordt.

NB 8

De residu's van de punten 6.1.3 en 6.2.2 mogen niet droog bij kamertemperatuur worden bewaard. Zodra ze worden verkregen, moet het oplosmiddel worden toegevoegd en daarna moeten ze in de koelkast worden bewaard.

6.3. **Gaschromatografie.**

6.3.1. Werkomstandigheden voor splitinjector:

- Injectortemperatuur: 300 °C.
- Detectortemperatuur: 320 °C.
- Integrator/recorder: De piek-integratieparameters moeten zodanig worden gekozen dat een juiste waarde van de piekoppervlakten wordt verkregen. Aanbevolen wordt de integrator in te stellen op dal/dal-integratie.
- Gevoeligheid: ongeveer 16 keer de minimumverzwakking.
- Geïnjecteerde hoeveelheid oplossing: 1 µl.
- Programmering oventemperatuur: eerst 235 °C gedurende zes minuten en daarna oplopend met 2 °C/min. tot 285 °C.
- Splitverhouding injector: 1 : 15.
- Draaggas: helium of waterstof bij een druk van ongeveer 120 kPa.

Deze omstandigheden kunnen afhankelijk van de kenmerken van de chromatograaf en de kolom zodanig worden aangepast dat chromatogrammen worden verkregen die aan de volgende eisen voldoen: de piek van de interne standaard moet binnen ongeveer vijf minuten van de bij punt 6.3.2 vermelde retentietijd liggen; de hoogte van de piek van de interne standaard moet minimaal 80 % van de volledige schaaluitslag zijn.

De gaschromatografieopstelling moet worden gecontroleerd door een mengsel van de voorraadoplossing van cholesta-3,5-dien (punt 5.6) en de oplossing van n-nonacosaan (punt 5.8) te injecteren. De piek van cholesta-3,5-dien moet vóór die van n-nonacosaan verschijnen (figuur 1c); wanneer dit niet gebeurt, kan de temperatuur van de oven worden verlaagd en/of kan de kolom worden vervangen door een kolom met een lagere polariteit.

6.3.2. Identificatie van de pieken

De piek van de interne standaard verschijnt bij een retentietijd van ongeveer 19 minuten en stigmasta-3,5-dien bij een relatieve retentietijd van ongeveer 1,29 (figuur 1b). Naast stigmasta-3,5-dien worden kleine hoeveelheden van een isomeer geëluëerd, die meestal geen aparte chromatografische piek opleveren. Als de kolom te polair is of een te hoge resolutie heeft, kan de isomeer echter als een kleine piek vlak voor die van stigmasta-3,5-dien verschijnen (figuur 2). Om ervoor te zorgen dat de stigmastadiënen als één piek worden geëluëerd, verdient het aanbeveling de kolom te vervangen door een kolom met een lagere polariteit of een grotere inwendige diameter.

▼M11*NB 9*

Een referentie voor stigmastadiënen kan worden verkregen door de analyse van een geraffineerde plantaardige olie met een kleinere monsterhoeveelheid (1-2 g). Hierbij leveren stigmastadiënen een duidelijke en gemakkelijk te identificeren piek op.

6.3.3. Kwantitatieve analyse

Het gehalte aan stigmastadiënen wordt berekend met de volgende formule:

$$\text{stigmastadiënen (mg/kg)} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

Hierbij is: A_s = piekoppervlak stigmastadiënen (als de piek in twee isomeren gesplitst is het totale oppervlak van de twee pieken);

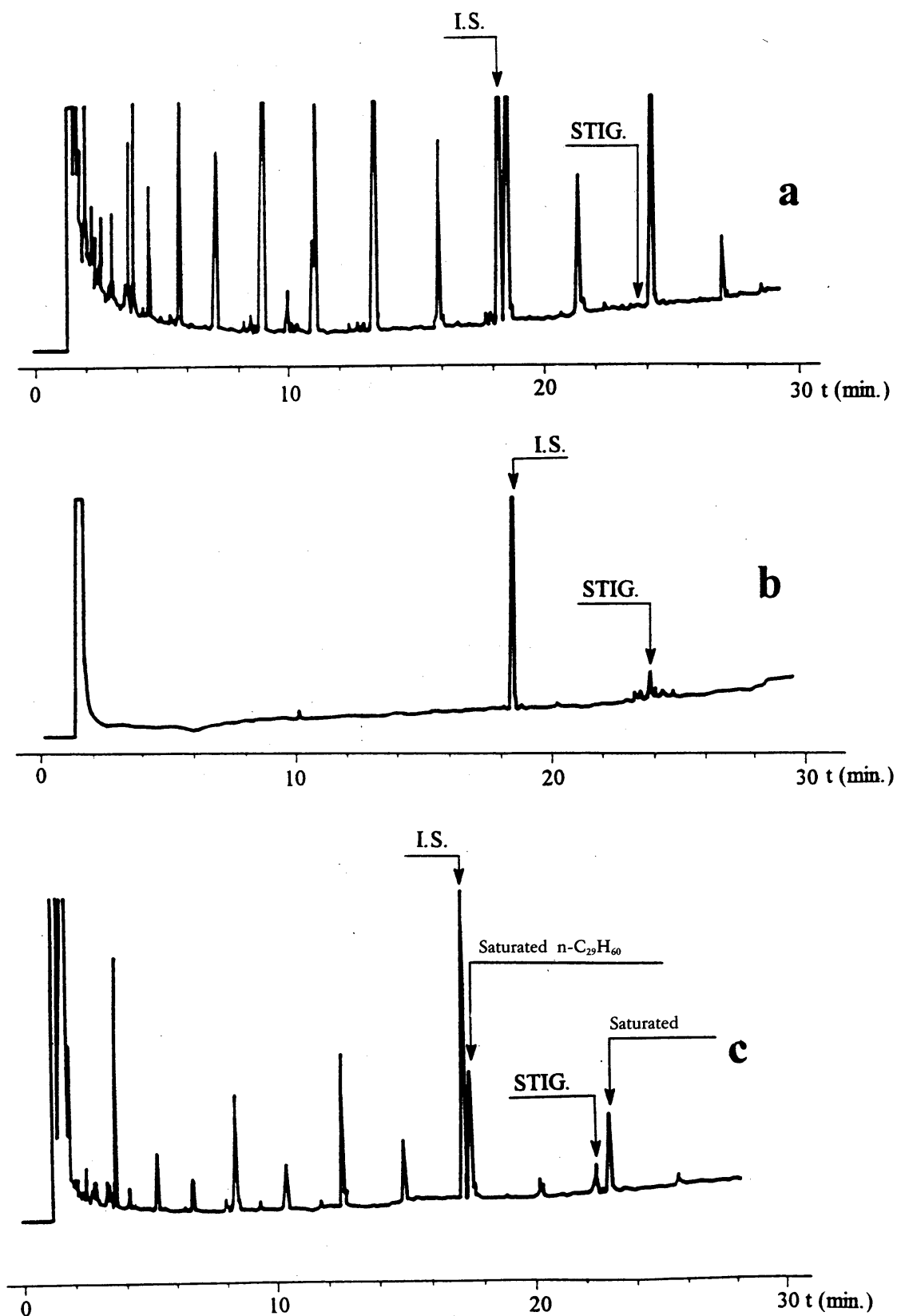
A_c = piekoppervlak interne standaard (cholestadiëen);

M_c = toegevoegde hoeveelheid interne standaard in μg ;

M_o = massa van het oliemonster in g.

Detectielimiet: ongeveer 0,01 mg/kg.

▼M11



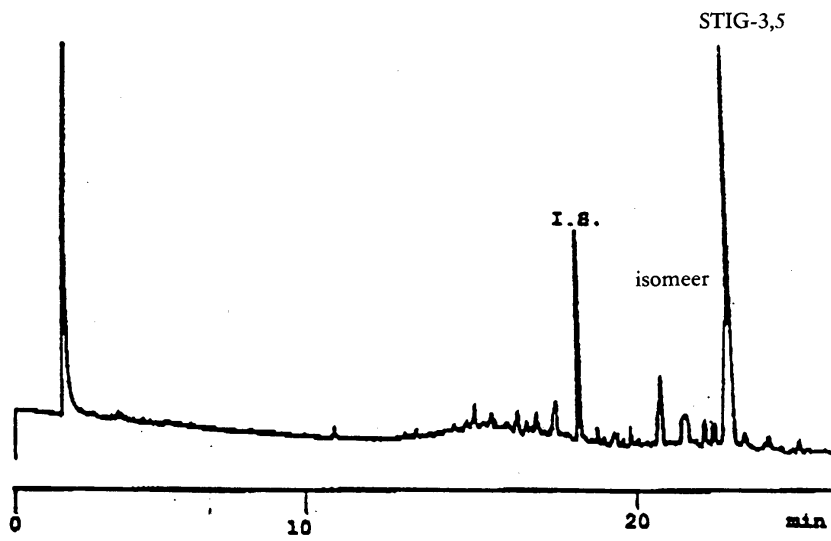
Figuur 1

Gaschromatogrammen van olijfoliemonsters over een fused-silica capillaire kolom (inwendige diameter 0,25 mm en lengte 25 m), gecoat met 5 % fenylmethylsilicon met een laagdikte van 0,25 μm .

- a) Eerste fractie (30 ml) van een olijfolie van eerste persing met interne standaard.
- b) Tweede fractie (40 ml) van een olijfolie met 0,10 mg/kg stigmastadiënen.

▼ M11

c) Tweede fractie (40 ml) met een kleine hoeveelheid van de eerste fractie.



Figuur 2

Gaschromatogram van een monster van geraffineerde olijfolie over een DB-5-kolom met het isomeer van stigmasta-3,5-dien.

▼ **M13***BIJLAGE XVIII***BEPALING VAN TRIACYLGLYCEROLEN MET ECN42 (VERSCHIL TUSSEN HPLC-GEGEVENS EN THEORETISCH GEHALTE)****1. Doel**

Bepaling van de samenstelling van triacylglycerolen (TAG's) in olijfolie, uitgedrukt als het equivalent koolstofgetal, aan de hand van de verschillen tussen de analyseresultaten verkregen met hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC) en het theoretische gehalte berekend op basis van de vetzuursamenstelling.

2. Toepassingsgebied

De norm geldt voor olijfolie. De methode geldt voor het detecteren van de aanwezigheid van kleine hoeveelheden zaadolie (rijk aan linolzuur) in elke klasse olijfolie.

3. Principe

Het gehalte aan triacylglycerolen met ECN42 bepaald door middel van HPLC-analyse en het theoretische gehalte aan triacylglycerolen met ECN42 (berekend op basis van de GLC-bepaling van de vetzuursamenstelling) stemmen voor zuivere olie binnen bepaalde grenzen overeen. Een verschil groter dan de waarden vermeld in het voorschrift voor elk soort olie wijst erop dat de olie zaadolie bevat.

4. Methode

De methode voor de berekening van het theoretische gehalte aan triacylglycerolen met ECN42 en van het verschil tussen dit gehalte en het resultaat van de HPLC-analyse bestaat in wezen uit het vergelijken van de met andere methoden verkregen analysegegevens; we kunnen drie fasen onderscheiden: bepaling van de vetzuursamenstelling door capillaire gaschromatografie, berekening van de theoretische samenstelling van triacylglycerolen met ECN42, en bepaling van het gehalte aan triacylglycerolen met ECN42 door HPLC-analyse.

4.1. Apparatuur

- 4.1.1. Rondbodemkolven 250 en 500 ml.
- 4.1.2. Bekerglazen 100 ml.
- 4.1.3. Glazen chromatografiekolom, inwendige diameter 21 mm, lengte 450 mm, kraan, met taps slijpstuk (vrouwelijk) bovenaan.
- 4.1.4. Scheitrechters van 250 ml, met taps slijpstuk (mannelijk) onderaan geschikt om boven aan de kolom te worden bevestigd.
- 4.1.5. Glazen staaf, lengte 600 mm.
- 4.1.6. Glazen trechter, diameter 80 mm.
- 4.1.7. Maatkolven van 50 ml.
- 4.1.8. Maatkolven van 20 ml.
- 4.1.9. Rotatievacuümverdamper.
- 4.1.10. Hogedrukvlloeistofchromatografie, met gethermostatiseerde kolomtemperatuur.
- 4.1.11. Injectietoestellen voor inspuiten van hoeveelheden van 10 µl.
- 4.1.12. Detector: differentiële refractometer. De gevoeligheid van de volle uitslag dient ten minste 10^{-4} eenheden van de brekingsindex te bedragen.
- 4.1.13. Kolom: roestvrijstalen buis, 250 mm (lengte) × 4,5 mm (inwendige diameter), gepakt met silicadeeltjes met een diameter van 5 µm en met 22 tot 23 % koolstof in de vorm van octadecylsilaan (opmerking 2).
- 4.1.14. Recorder en/of integrator.

▼ **M13****4.2. Reagentia**

De reagentia dienen van pro-analysekwaliteit te zijn. Elutievloeistoffen dienen te worden ontgast en kunnen verschillende keren worden hergebruikt zonder gevolgen voor de scheidingen.

- 4.2.1. Petroleumether, 40-60 °C voor chromatografie.
- 4.2.2. Ethylether, vrij van peroxiden, zojuist gedistilleerd.
- 4.2.3. Elutievloeistof voor gaschromatografie: mengsel van petroleumether/ethylether 87/13 (v/v).
- 4.2.4. Silicagel, korrelgrootte 70-230 mesh, type Merck 7734, op een standaardwatergehalte van 5 % gebracht (m/m).
- 4.2.5. Glaswol.
- 4.2.6. Aceton.
- 4.2.7. Acetonitril.
- 4.2.8. HPLC-elutievloeistof: acetonitril + aceton (verhouding aan te passen om de gewenste scheiding te krijgen; begin met een 50:50 mengsel).
- 4.2.9. Oplosmiddel: aceton.
- 4.2.10. Referentietriglyceriden: ofwel kunnen triglyceriden van handelskwaliteit (tripalmitaat, trioleïne, enz.) worden gebruikt, waarvan de retentietijden worden uitgezet volgens het equivalent koolstofgetal, ofwel kunnen referentiechromatogrammen worden verkregen uitgaande van sojaolie, een 30:70 mengsel sojaolie/olijfolie en pure olijfolie (zie opmerkingen 3 en 4 en figuren 1, 2, 3 en 4).

4.3. Monsterbereiding

Aangezien een aantal interfererende stoffen vals positieve resultaten kunnen oproepen, moet het monster altijd worden gezuiverd volgens IUPAC-methode 2.507 betreffende de bepaling van polaire stoffen in geoxideerde oliën.

4.3.1. Bereiding van de chromatografiekolom

Vul de kolom (4.1.3) met circa 30 ml elutievloeistof (4.2.3); breng een prop glaswol (4.2.5) in en druk deze met de glazen staaf (4.1.5) tot onder in de kolom.

Bereid in een bekerglas van 100 ml een suspensie van 25 g silicagel (4.2.4) in 80 ml van het elutiemengsel (4.2.3) en breng deze over in de kolom met behulp van een glazen trechter (4.1.6).

Om er zeker van te zijn dat het silicagel volledig in de kolom wordt overgebracht, het bekerglas met het elutiemengsel uitspoelen en de wasparties ook in de kolom overbrengen.

De kraan aan de kolom openen en het oplosmiddel eruit laten stromen tot de vloeistofspiegel van de elutievloeistof 1 cm boven het silicagel staat.

4.3.2. Kolomchromatografie

Weeg op 0,001 g nauwkeurig $2,5 \pm 0,1$ g gefiltreerde, gehomogeniseerde en, indien nodig, gedroogde olie af in een maatkolf van 50 ml (4.1.7). Los dit op in ongeveer 20 ml elutievloeistof (4.2.3). Indien nodig, licht verwarmen om het oplossen te vergemakkelijken. Laat het mengsel afkoelen tot omgevingstemperatuur en vul tot de maatstreep aan met elutievloeistof.

Breng met een maatpipet 20 ml van de oplossing aan op de volgens 4.3.1 bereide kolom; open de kraan en laat het oplosmiddel uitstromen tot het niveau van het silicagel.

De oplossing moet vervolgens worden geëludeerd met 150 ml elutievloeistof (4.2.3), waarbij de stroomsnelheid moet worden afgeregeld tot ongeveer 2 ml/min (zodat 150 ml in 60-70 minuten door de kolom stroomt).

Vang het eluaat op in een kolf van 250 ml (4.1.1) die vooraf in de oven is gekalibreerd en exact is gewogen. Verwijder het oplosmiddel bij lage druk (Rotavapor) en weeg het residu; hiermee wordt de oplossing bereid voor HPLC-analyse en voor de bereiding van de methylesters.

▼ **M13**

Voor de categorieën extra olijfolie van eerste persing, olijfolie van eerste persing, geraffineerde olijfolie en olijfolie moet, nadat het monster door de kolom gestroomd is, daarvan minimaal 90 % worden teruggewonnen; voor olijfolie voor verlichting en olijfolie uit afvallen van olijen geldt een terugwinningspercentage van minimaal 80.

4.4. **HPLC-analyse**4.4.1. **Monsterbereiding voor chromatografische analyse**

Een 5 %-oplossing van het te analyseren monster wordt bereid door 0,5 ± 0,001 g van het monster in een maatkolf van 10 ml af te wegen en aan te lengen tot 10 ml met het oplosmiddel (4.2.9).

4.4.2. **Werkwijze**

Stel het chromatografiesysteem op. Pomp de elutievlloeistof (4.2.8) op met een snelheid van 1,5 ml/min teneinde het volledige systeem te zuiveren. Wacht tot er een stabiele basislijn wordt verkregen. Injecteer 10 µl van het volgens punt 4.3 bereide monster.

4.4.3. **Berekening en uitdrukking van resultaten**

Gebruik de methode met interne standaard, dat wil zeggen ga ervan uit dat de som van de piekoppervlakken voor de TAG's met ECN42 t/m ECN 52 gelijk is aan 100 %. Bereken het relatieve percentage van elk triglyceride aan de hand van de formule:

% triglyceride = piekoppervlak × 100 / som van de piekoppervlakken.

Het resultaat wordt opgegeven met minstens twee cijfers achter de komma.

Opmerking 1: De elutievolgorde kan worden bepaald door het berekenen van de equivalente koolstofgetallen, dikwijls gedefinieerd met de vergelijking $ECN = CN - 2n$, waarin CN het koolstofgetal is en n het aantal dubbele bindingen; zij kan preciezer worden berekend door rekening te houden met de oorsprong van de dubbele binding. Als n_o , n_i en n_{in} de aantallen dubbele bindingen zijn die respectievelijk worden toegeschreven aan oleïnezuur, linolzuur en linoleenzuur, kan het equivalent koolstofgetal worden berekend aan de hand van de formule:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_i n_i - d_{in} n_{in}$$

waarin de coëfficiënten d_o , d_i en d_{in} kunnen worden berekend door middel van de referentietriglyceriden. Onder de in deze methode gespecificeerde voorwaarden zal de verkregen vergelijking dicht liggen bij;

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_i) - (2,17 n_{in})$$

Opmerkingen 2: Voorbeelden: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333

Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art 50377 of een soortgelijk product

Opmerking 3: Met verschillende referentietriglyceriden kan ook de resolutie ten opzichte van trioleïne berekend worden:

$$\alpha = RT^1 / RT \text{ trioleïne}$$

door gebruik van de gereduceerde retentietijd $RT^1 = RT - RT\text{-oplosmiddel}$.

De grafiek van $\log \alpha$ tegen f (aantal dubbele bindingen) maakt het mogelijk de retentiewaarden te bepalen voor alle triglyceriden van vetzuren in de referentietriglyceriden (zie figuur 2).

Opmerking 4: De efficiëntie van de kolom dient zodanig te zijn dat de trioleïnepiek duidelijk gescheiden is van de pieken van triglyceriden met een aangrenzende RT. De elutie wordt uitgevoerd tot de piek van ECN52.

Opmerking 5: Om een chromatogram te krijgen dat een juiste meting van de oppervlakken van alle belangrijke pieken mogelijk maakt, moet de tweede piek die overeenkomt met ECN50 een intensiteit (hoogte) hebben van 50 % van de volle uitslag.

▼ **M13**4.5. **Berekening van de samenstelling van de triacylglycerolen**

4.5.1. Bepaling van de vetzuursamenstelling

De vetzuursamenstelling wordt bepaald met de EEG-gaschromatografische methode vermeld in bijlage X.A van Verordening (EEG) nr. 2568/91 met behulp van een capillaire kolom. De bereiding van methylesters wordt uitgevoerd volgens bijlage X.B (oplossing van natriummethylaat in alcohol).

4.5.2. Vetzuren gebruikt bij de berekening

Glyceriden zijn gegroepeerd volgens hun equivalent koolstofgetal (ECN), rekening houdend met de volgende equivalenties tussen ECN en vetzuren. Er werden alleen vetzuren met 16 en 18 koolstofatomen in aanmerking genomen, aangezien alleen deze van belang zijn voor olijfolie.

Vetzuur (VZ)	Afkorting	Molecuulgewicht (MG)	ECN
Palmitinezuur	P	256,4	16
Palmitoleïnezuur	Po	254,4	14
Stearinezuur	S	284,5	18
Oleïnezuur	O	282,5	16
Linolzuur	L	280,4	14
Linoleenzuur	Ln	278,4	12

4.5.3. Omrekening van oppervlak % in aantal mol voor alle vetzuren

$$\left. \begin{array}{l} \text{aantal mol P} = \frac{\text{opp. \% P}}{\text{MG P}} \quad \text{aantal mol S} = \frac{\text{opp. \% S}}{\text{MG S}} \quad \text{aantal mol Po} = \frac{\text{opp. \% Po}}{\text{MG Po}} \\ \text{aantal mol O} = \frac{\text{opp. \% O}}{\text{MG O}} \quad \text{aantal mol L} = \frac{\text{opp. \% L}}{\text{MG L}} \quad \text{aantal mol Ln} = \frac{\text{opp. \% Ln}}{\text{MG Ln}} \end{array} \right\} (1)$$

4.5.4. Normalisering van vetzuren tot 100 %

$$\left. \begin{array}{l} \text{mol \% P (1,2,3)} = \frac{\text{aantal mol P} * 100}{\text{aantal mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{mol \% S (1,2,3)} = \frac{\text{aantal mol S} * 100}{\text{aantal mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{mol \% Po (1,2,3)} = \frac{\text{aantal mol Po} * 100}{\text{aantal mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{mol \% O (1,2,3)} = \frac{\text{aantal mol O} * 100}{\text{aantal mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{mol \% L (1,2,3)} = \frac{\text{aantal mol L} * 100}{\text{aantal mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{mol \% Ln (1,2,3)} = \frac{\text{aantal mol Ln} * 100}{\text{aantal mol (P + S + Po + O + L + Ln)}} \end{array} \right\} (2)$$

Het resultaat geeft het vetzuurpercentage in mol % in de globale (1,2,3-)positie van de TAG's.

Vervolgens wordt de som van de verzadigde vetzuren (VVZ) P en S en de onverzadigde vetzuren (OVZ) Po, O, L en Ln berekend:

$$\left. \begin{array}{l} \text{mol \% VVZ} = \text{mol \% P} + \text{mol \% S} \\ \text{mol \% OVZ} = 100 - \text{mol \% VVZ} \end{array} \right\} (3)$$

▼ **M13**

4.5.5. Berekening van de vetzuursamenstelling in 2- en 1,3-posities van TAG's

De vetzuren zijn als volgt over de drie groepen verdeeld: twee identieke voor 1- en 3-posities en één voor de 2-positie, met verschillende coëfficiënten voor de verzadigde (P en S) en de onverzadigde zuren (Po, O, L en Ln).

4.5.5.1. Verzadigde vetzuren op de 2-positie [P(2) en S(2)]

$$\begin{aligned} \text{mol \% P(2)} &= \text{mol \% P (1,2,3)} * 0,06 \\ \text{mol \% S(2)} &= \text{mol \% S (1,2,3)} * 0,06 \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{mol \% P(2)} \\ \text{mol \% S(2)} \end{aligned}} \right\} (4)$$

4.5.5.2. Onverzadigde vetzuren op de 2-positie [Po(2), O(2), L(2) en Ln(2)]:

$$\begin{aligned} \text{mol \% Po(2)} &= \frac{\text{mol \% Po(1,2,3)}}{\text{mol \% OVZ}} * (100 - \text{mol \% P(2)} - \text{mol \% S(2)}) \\ \text{mol \% O(2)} &= \frac{\text{mol \% O(1,2,3)}}{\text{mol \% OVZ}} * (100 - \text{mol \% P(2)} - \text{mol \% S(2)}) \\ \text{mol \% L(2)} &= \frac{\text{mol \% L(1,2,3)}}{\text{mol \% OVZ}} * (100 - \text{mol \% P(2)} - \text{mol \% S(2)}) \\ \text{mol \% Ln(2)} &= \frac{\text{mol \% Ln(1,2,3)}}{\text{mol \% OVZ}} * (100 - \text{mol \% P(2)} - \text{mol \% S(2)}) \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{mol \% Po(2)} \\ \text{mol \% O(2)} \\ \text{mol \% L(2)} \\ \text{mol \% Ln(2)} \end{aligned}} \right\} (5)$$

4.5.5.3. Vetzuren in 1,3-posities [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) en Ln(1,3)]:

$$\begin{aligned} \text{mol \% P1,3} &= \frac{\text{mol \% P1,2,3} - \text{mol \% P(2)}}{2} + \text{mol \% P(1,2,3)} \\ \text{mol \% S(1,3)} &= \frac{\text{mol \% S(1,2,3)} - \text{mol \% S(2)}}{2} + \text{mol \% S(1,2,3)} \\ \text{mol \% Po(1,3)} &= \frac{\text{mol \% Po(1,2,3)} - \text{mol \% Po(2)}}{2} + \text{mol \% Po(1,2,3)} \\ \text{mol \% O(1,3)} &= \frac{\text{mol \% O(1,2,3)} - \text{mol \% O(2)}}{2} + \text{mol \% O(1,2,3)} \\ \text{mol \% L(1,3)} &= \frac{\text{mol \% L(1,2,3)} - \text{mol \% L(2)}}{2} + \text{mol \% L(1,2,3)} \\ \text{mol \% Ln(1,3)} &= \frac{\text{mol \% Ln(1,2,3)} - \text{mol \% Ln(2)}}{2} + \text{mol \% Ln(1,2,3)} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{mol \% P1,3} \\ \text{mol \% S(1,3)} \\ \text{mol \% Po(1,3)} \\ \text{mol \% O(1,3)} \\ \text{mol \% L(1,3)} \\ \text{mol \% Ln(1,3)} \end{aligned}} \right\} (6)$$

4.5.6. Berekening van triacylglycerolen

4.5.6.1. TAG's met één vetzuur (AAA, hier LLL, PoPoPo)

$$\text{mol \% AAA} = \frac{\text{mol \% A(1,3)} * \text{mol \% A(2)} * \text{mol \% A(1,3)}}{10\,000} \quad (7)$$

4.5.6.2. TAG's met twee vetzuren (AAB, hier PoPoL, PoLL)

$$\begin{aligned} \text{mol \% AAB} &= \frac{\text{mol \% A(1,3)} * \text{mol \% A(2)} * \text{mol \% B(1,3)} * 2}{10\,000} \\ \text{mol \% ABA} &= \frac{\text{mol \% A(1,3)} * \text{mol \% B(2)} * \text{mol \% A(1,3)}}{10\,000} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{mol \% AAB} \\ \text{mol \% ABA} \end{aligned}} \right\} (8)$$

▼ **M13**

4.5.6.3. TAG's met drie vetzuren (ABC, hier OLLn, PLLn, PoOLn, PPOln)

$$\left. \begin{aligned} \text{mol \% ABC} &= \frac{\text{mol \% A(1,3)} * \text{mol \% B(2)} * \text{mol \% C(1,3)} * 2}{10000} \\ \text{mol \% BCA} &= \frac{\text{mol \% B(1,3)} * \text{mol \% C(2)} * \text{mol \% A(1,3)} * 2}{10000} \\ \text{mol \% CAB} &= \frac{\text{mol \% C(1,3)} * \text{mol \% A(2)} * \text{mol \% B(1,3)} * 2}{10000} \end{aligned} \right\} (9)$$

4.5.6.4. Triacylglyceriden met ECN42

De volgende triglyceriden met ECN42 worden berekend volgens vergelijking 7, 8 en 9 in volgorde van verwachte elutie in HPLC (normaal slechts drie pieken).

LLL

PoLL en de positie-isomeer LPOl

OLLn en de positie-isomeren OLnL en LnOL

PoPoL en de positie-isomeer PoLPo

PoOLn en de positie-isomeren OPoLn en OLnPo

PLLn en de positie-isomeren LLnP en LnPL

PoPoPo

SLnLn en de positie-isomeer LnSLn

PPoLn en de positie-isomeren PLnPo en PoPLn

De som van de negen triacylglycerolen, inclusief de positie-isomeren, geeft de triacylglyceriden met ECN42. Het resultaat moet worden opgegeven met minstens twee cijfers achter de komma.

5. Beoordeling van het resultaat

Het berekende theoretische gehalte en het gehalte bepaald met HPLC-analyse worden vergeleken. Als het verschil tussen de HPLC-gegevens en de theoretische gegevens groter is dan de waarden die voor de betrokken categorie olie in de verordening zijn vermeld, dan bevat het monster zaadolie.

Opmerking: De resultaten worden opgegeven met één cijfer achter de komma.

6. Voorbeeld (De nummers verwijzen naar de secties in de tekst van de methode)

4.5.1. Berekening van mol % vetzuren uit GLC-gegevens (oppervlak %)

De volgende gegevens voor de vetzuursamenstelling worden verkregen door middel van GLC:

VZ MG	P 256,4	S 284,5	Po 254,4	O 282,5	L 280,4	Ln 278,4
opp. %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

4.5.3. Omrekening van oppervlak % in aantal mol voor alle vetzuren

$$\text{aantal mol P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ mol P} \quad \text{Zie formule (1)}$$

$$\text{aantal mol S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ mol S} \quad \text{Zie formule (1)}$$

▼ **M13**

$$\text{aantal mol Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ mol Po} \quad \text{Zie formule (1)}$$

$$\text{aantal mol O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ mol O} \quad \text{Zie formule (1)}$$

$$\text{aantal mol L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ mol L} \quad \text{Zie formule (1)}$$

$$\text{aantal mol Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ mol Ln} \quad \text{Zie formule (1)}$$

$$\text{Totaal} = 0,35822 \text{ moles TG}$$

4.5.4. Normalisering van de vetzuren tot 100 %

$$\text{mol \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ mol P} * 100}{0,35822 \text{ mol}} = 10,888 \% \quad \text{Zie formule (2)}$$

$$\text{mol \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ mol S} * 100}{0,35822 \text{ mol}} = 2,944 \% \quad \text{Zie formule (2)}$$

$$\text{mol \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ mol Po} * 100}{0,35822 \text{ mol}} = 1,097 \% \quad \text{Zie formule (2)}$$

$$\text{mol \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ mol O} * 100}{0,35822 \text{ mol}} = 74,113 \% \quad \text{Zie formule (2)}$$

$$\text{mol \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ mol L} * 100}{0,35822 \text{ mol}} = 9,956 \% \quad \text{Zie formule (2)}$$

$$\text{mol \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ mol Ln} * 100}{0,35822 \text{ mol}} = 1,003 \% \quad \text{Zie formule (2)}$$

$$\text{Totaal mol \%} = 100,0 \%$$

Som van de verzadigde en onverzadigde vetzuren in 1,2,3-posities van TAG's:

$$\text{mol \% VVZ} = 10,888 \% + 2,944 \% = 13,831 \% \quad \text{Zie formule (3)}$$

$$\text{mol \% OVZ} = 100,000 \% - 13,831 \% = 86,169 \% \quad \text{Zie formule (3)}$$

4.5.5. Berekening van de vetzuursamenstelling in 2- en 1,3-posities van de TAG's

4.5.5.1. Verzadigde vetzuren op de 2-positie [P(2) en S(2)]

$$\text{mol \% P(2)} = 10,888 \% * 0,06 = 0,653 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (4)}$$

$$\text{mol \% S(2)} = 2,944 \% * 0,06 = 0,177 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (4)}$$

4.5.5.2. Onverzadigde vetzuren in 1,3-posities [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) en Ln(1,3)]

$$\text{mol \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,169 \%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 1,263 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (5)}$$

$$\text{mol \% O(2)} = \frac{74,113 \%}{86,169 \%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 85,295 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (5)}$$

$$\text{mol \% L(2)} = \frac{9,956 \%}{86,169 \%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 11,458 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (5)}$$

$$\text{mol \% Ln(2)} = \frac{1,003 \%}{86,169 \%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 1,154 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (5)}$$

▼ **M13**

4.5.5.3. Vetzuren in 1,3-posities [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) en Ln(1,3)]

$$\text{mol \% P(1,3)} = \frac{10,888 - 0,659}{2} \quad 10,888 = 16,005 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (6)}$$

$$\text{mol \% S(1,3)} = \frac{2,944 - 0,177}{2} \quad 2,944 = 4,327 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (6)}$$

$$\text{mol \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,263}{2} \quad 1,097 = 1,015 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (6)}$$

$$\text{mol \% O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,295}{2} \quad 74,113 = 68,522 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (6)}$$

$$\text{mol \% L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} \quad 9,956 = 9,205 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (6)}$$

$$\text{mol \% Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} \quad 1,003 = 0,927 \text{ mol \%} \quad \text{Zie formule (6)}$$

4.5.6. Berekening van triacylglycerolen

Uit de berekende vetzuursamenstelling in sn-2- en sn-1,3-posities (zie boven)

VZ in	1,3-pos.	2-pos.
P	16,005 %	0,653 %
S	4,327 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,263 %
O	68,522 %	85,295 %
L	9,205 %	11,458 %
Ln	0,927 %	1,154 %
Som	100,0 %	100,0 %

worden de volgende triacylglycerolen berekend:

LLL

PoPoPo

PoLL met 1 positie-isomeer

SLnLn met 1 positie-isomeer

PoPoL met 1 positie-isomeer

PPoLn met 2 positie-isomeren

OLLn met 2 positie-isomeren

PLLn met 2 positie-isomeren

PoOLn met 2 positie-isomeren

4.5.6.1. TAG's met één vetzuur (LLL, PoPoPo) Zie formule (7)

$$\text{mol \% LLL} = \frac{9,205 \% * 11,458 \% * 9,205 \%}{10000} = 0,09708 \text{ mol LLL}$$

$$\text{mol \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 1,015 \%}{10000} = 0,00013 \text{ mol PoPoPo}$$

4.5.6.2. TAG's met drie verschillende vetzuren (PoLL, SLnLn, PoPoL) Zie formule (8)

$$\text{mol \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,02141$$

▼ **M13**

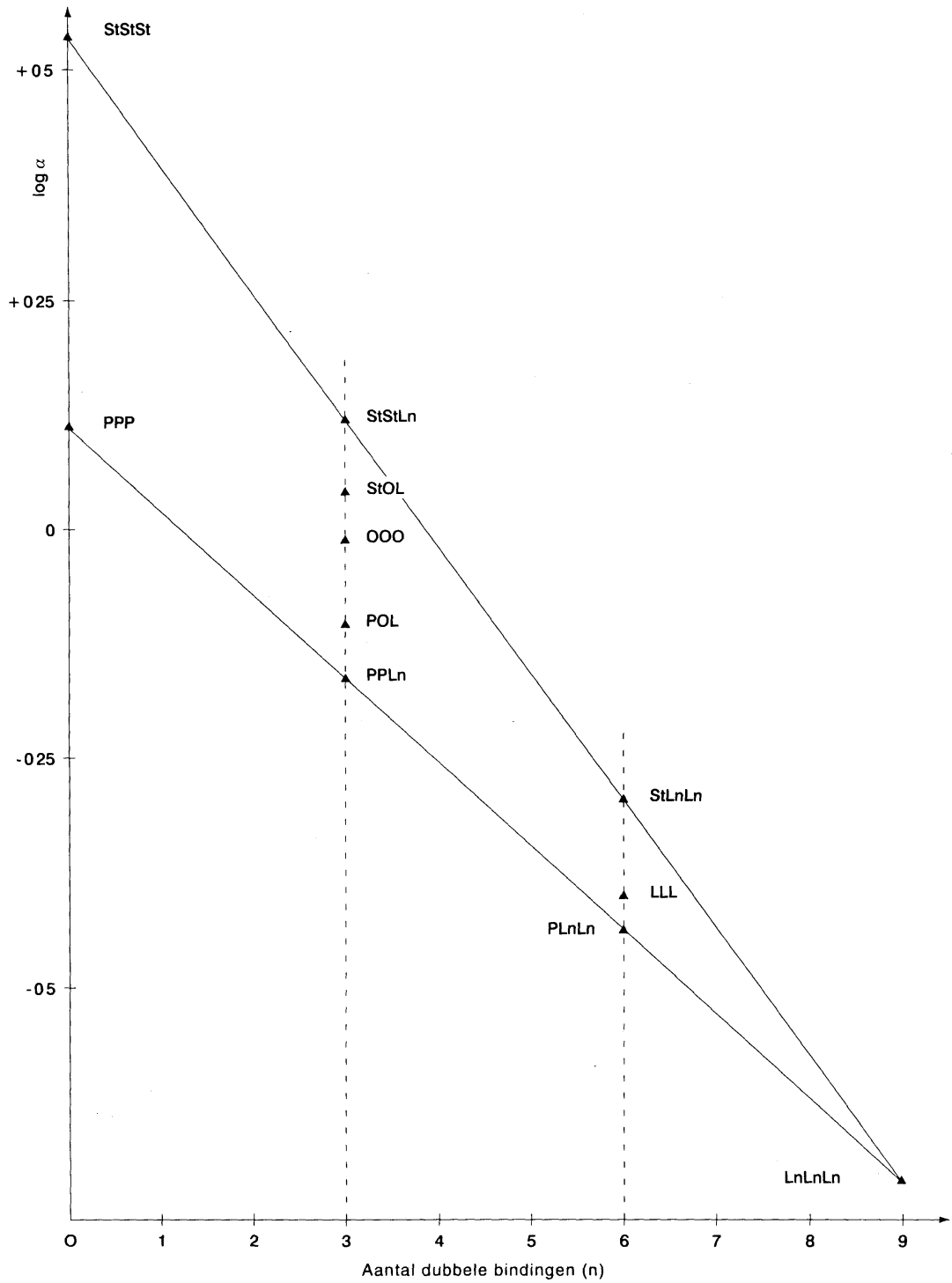
$$\begin{aligned} \text{mol \% LPoL} &= \frac{9,205 \% * 1,263 \% * 9,205 \%}{10\,000} &&= 0,01070 \\ &&&0,03211 \text{ mol PoLL} \\ \text{mol \% SLnLn} + \text{LnLnS} &= \frac{4,327 \% * 1,154 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} &&= 0,00093 \\ \text{mol \% LnSLn} &= \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\,000} &&= 0,00002 \\ &&&0,00095 \text{ mol SLnLn} \\ \text{mol \% PoPoL} + \text{LPoPo} &= \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} &&= 0,00236 \\ \text{mol \% PoLPo} &= \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 1,015 \%}{10\,000} &&= 0,00118 \\ &&&0,00354 \text{ mol PoPoL} \end{aligned}$$

4.5.6.3. TAG's met drie verschillende vetzuren (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)

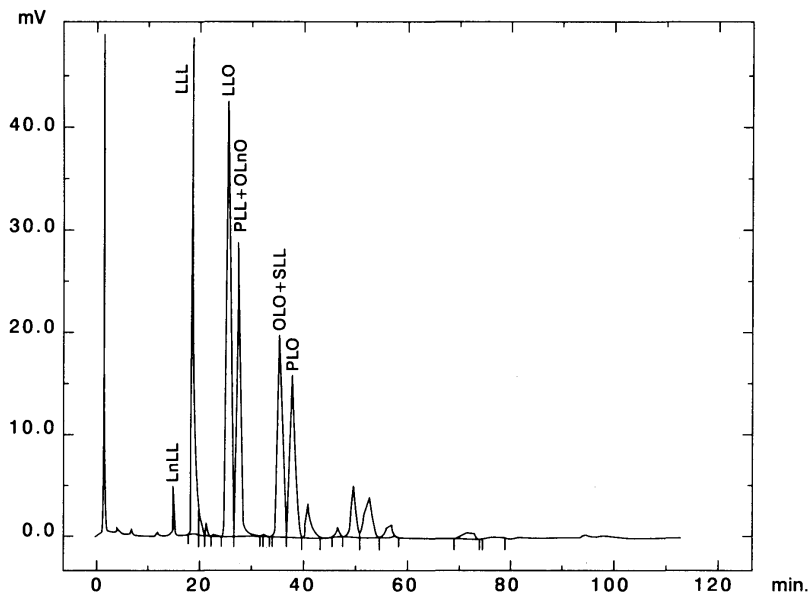
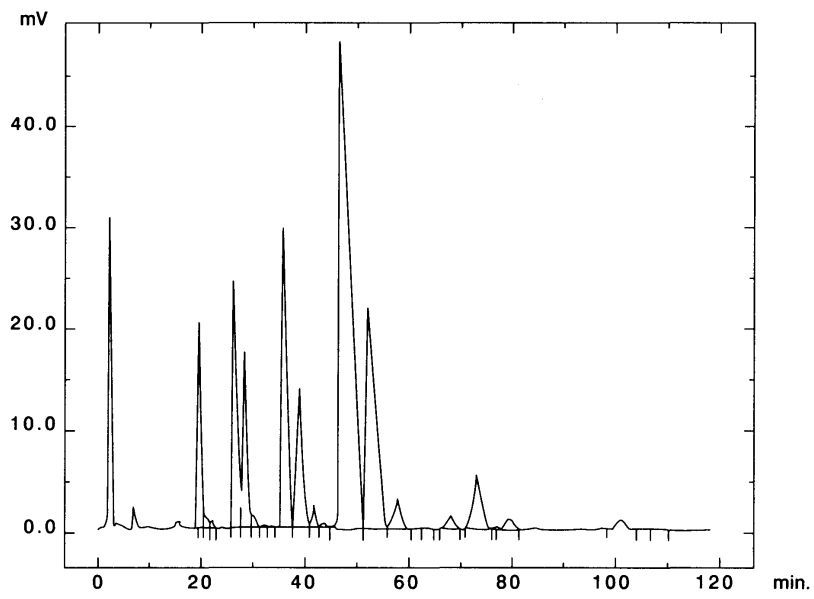
Zie formule (9)

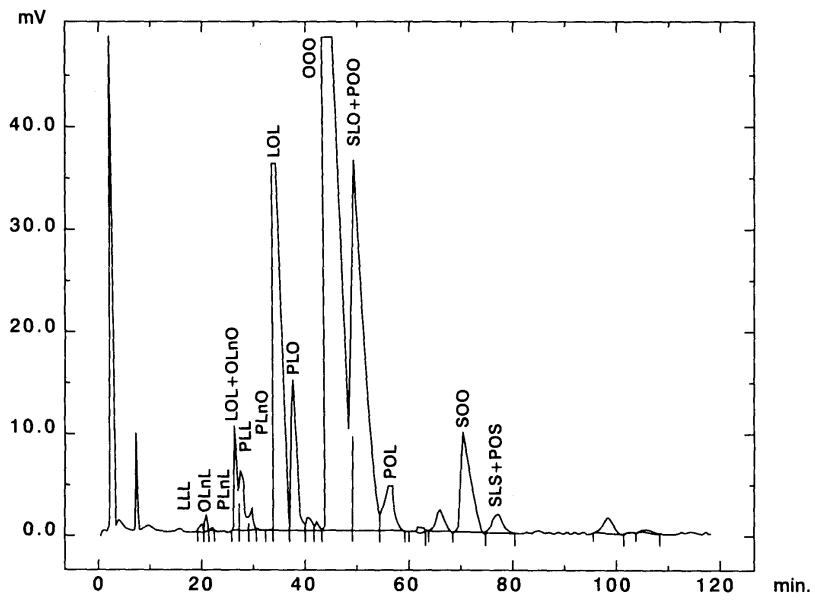
$$\begin{aligned} \text{mol \% PPOln} &= \frac{16,005 \% * 1,263 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} &&= 0,00375 \\ \text{mol \% LnPPo} &= \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} &&= 0,00012 \\ \text{mol \% PoLnP} &= \frac{1,015 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10\,000} &&= 0,00375 \\ &&&0,00762 \text{ mol PPOln} \\ \text{mol \% OLLn} &= \frac{68,522 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} &&= 0,14577 \\ \text{mol \% LnOL} &= \frac{0,927 \% * 85,295 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} &&= 0,14577 \\ \text{mol \% LLnO} &= \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 68,522 \% * 2}{10\,000} &&= 0,14577 \\ &&&0,43671 \text{ mol OLLn} \\ \text{mol \% PLLn} &= \frac{16,005 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} &&= 0,03400 \\ \text{mol \% LnPL} &= \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} &&= 0,00111 \\ \text{mol \% LLnP} &= \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10\,000} &&= 0,03400 \\ &&&0,06911 \text{ mol PLLn} \\ \text{mol \% PoOLn} &= \frac{1,015 \% * 85,295 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} &&= 0,01605 \\ \text{mol \% LnPoO} &= \frac{0,927 \% * 1,263 \% * 68,522 \% * 2}{10\,000} &&= 0,01605 \\ \text{mol \% OLnPo} &= \frac{68,522 \% * 1,154 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} &&= 0,01605 \\ &&&0,04815 \text{ mol PoOLn} \\ \text{ECN42} &&&= 0,69540 \text{ mol TAG's} \end{aligned}$$

▼ M14

Figuur 1: Grafiek van $\log a$ tegen f (aantal dubbele bindingen)

La = laurinezuur, My = myristinezuur; P = palmitinezuur; St = stearinezuur, O = oliezuur; L = linolzuur, Ln = linoleenzuur.

▼ **M14****Figuur 2: Sojaolie****Figuur 3: Sojaolie/olijfolie 30/70**

▼ **M14****Figuur 4: Olijfolie**

▼ **M19***BIJLAGE XIX***BEPALING VAN HET GEHALTE AAN ALIFATISCHE ALCOHOLEN
MET BEHULP VAN CAPILLAIRE GASCHROMATOGRAFIE**

1. DOEL

In deze methode wordt een werkwijze beschreven om op eenvoudige wijze het totale gehalte aan alifatische alcoholen in vetten te bepalen.

2. PRINCIPE VAN DE METHODE

De vetten, waaraan 1-eicosanol als interne standaard is toegevoegd, worden verzeept met behulp van een oplossing van kaliumhydroxide in ethanol. Vervolgens worden de onverzeepbare bestanddelen geëxtraheerd met ethylether. De alcoholfractie wordt van het onverzeepbare extract gescheiden door middel van dunnelaagchromatografie met een basische silicagel als stationaire fase. De alcoholen in de silicagel worden omgezet in trimethylsilylethers en geanalyseerd door middel van gaschromatografie in een capillaire kolom.

3. APPARATUUR

- 3.1. Erlenmeyer van 250 ml met een refluxkoeler met geslepen uiteinde.
 - 3.2. Scheitrechter van 500 ml.
 - 3.3. Erlenmeyers van 250 ml.
 - 3.4. Volledige uitrusting voor dunnelaagchromatografie, met glasplaten van 20 × 20 cm.
 - 3.5. Ultraviolette lamp, met een golflengte van 366 of 254 nm.
 - 3.6. Micropipetten van 100 en 500 µl.
 - 3.7. Filterkroes G 3 (porositeit 15 tot 40 µm) met een diameter van ongeveer 2 cm en een hoogte van 5 cm, geschikt om onder vacuüm te filtreren en voorzien van een slijpstuk 12/21.
 - 3.8. Afzuigkolf van 50 ml voorzien van een slijpstuk 12/21 waarmee deze op de filterkroes kan worden aangesloten (3.7).
 - 3.9. Konisch afgeronde centrifugebuis van 10 ml, afsluitbaar.
 - 3.10. Gaschromatograaf, geschikt voor het werken met een capillaire kolom, voorzien van een splitsysteem, bestaande uit:
 - 3.10.1. Een gethermostatiseerde ruimte waarmee de kolommen op de gewenste temperatuur kunnen worden gehouden met een nauwkeurigheid van ± 1 °C.
 - 3.10.2. Een temperatuurregelbare injector met een gepersilaniseerd glazen verdampingselement.
 - 3.10.3. Een vlamionisatiedetector en een versterker-/verzwakkereenheid.
 - 3.10.4. Een integrerende recorder, geschikt voor gebruik met de versterker-/verzwakkereenheid (3.10.3), met een responstijd van niet meer dan één seconde en met een variabele papersnelheid.
 - 3.11. Een glazen of fused-silica capillaire kolom met een lengte van 20-30 m, inwendige diameter 0,25-0,32 mm, inwendig gecoat met SE-52- of SE-54-vloeistof of equivalent in een uniforme dikte tussen 0,10 en 0,30 µm.
 - 3.12. Gaschromatografische injectiespuit van 10 µl met een geharde naald.
 - 3.13. Precisiebalans met een gevoeligheid van 1 mg (af te lezen tot op 0,1 mg).
4. REAGENTIA
 - 4.1. Kaliumhydroxideoplossing, ongeveer 2 N in ethanol. Los 130 g kaliumhydroxide (minimumgehalte 85 %) onder koeling op in 200 ml gedistilleerd water en vul aan tot 1 l met ethanol. Bewaar de oplossing in goed afgesloten flessen van donker glas.
 - 4.2. Diëthylether, p.a.
 - 4.3. Natriumsulfaat, p.a., watervrij.

▼ **M19**

- 4.4. Glazen dunnelaagplaten gecoat met kiezelgel, zonder fluorescentie-indicator, met een dikte van 0,25 mm (deze zijn gebruiksklaar in de handel te verkrijgen).
- 4.5. Kaliumhydroxideoplossing, ongeveer 0,2 N in ethanol. Los 13 g kaliumhydroxide op in 20 ml gedistilleerd water en vul met methanol aan tot 1 l.
- 4.6. Benzeen, voor chromatografische doeleinden (5.2.2).
- 4.7. Aceton, voor chromatografische doeleinden (5.2.2).
- 4.8. Hexaan, voor chromatografische doeleinden (5.2.2).
- 4.9. Ethylether, voor chromatografische doeleinden (5.2.2).
- 4.10. Chloroform, p.a.
- 4.11. Dunnelaagchromatografische referentieoplossing. Een 5 %-oplossing van een mengsel van C20-C28-alcoholen in chloroform.
- 4.12. 2,7-dichloorfluoresceïne, 0,2 % oplossing in ethanol. Deze oplossing moet licht basisch worden gemaakt door toevoeging van enkele druppels 2 N alcoholische kaliumhydroxideoplossing.
- 4.13. Pyridine, watervrij, voor chromatografische doeleinden.
- 4.14. Hexamethyldisilazaan.
- 4.15. Trimethylchloorsilaan.
- 4.16. Standaardoplossingen van de trimethylsilylethers van de C20-C28 alifatische alcoholen. Direct vóór gebruik te bereiden uit een mengsel van de zuivere alcoholen.
- 4.17. 1-eicosanol, 0,1 % (m/v) oplossing in chloroform (interne standaard).
- 4.18. Draaggas: waterstof of helium, gaschromatografisch zuiver.
- 4.19. Hulpgasen: stikstof, gaschromatografisch zuiver.
5. WERKWIJZE
- 5.1. **Bereiding van het onverzeepbare residu**
 - 5.1.1. Breng in de kolf van 250 ml met behulp van de injectiespuit van 500 µl een hoeveelheid 0,1 % 1-eicosanoloplossing in chloroform (4.17) die overeenkomt met ongeveer 10 % van het gehalte aan alifatische alcoholen in het in bewerking te nemen monster. Bijvoorbeeld: voeg voor 5 g monster 250 µl 0,1 % 1-eicosanoloplossing toe indien het gaat om olijfolie en 1 500 µl indien het gaat om olie uit afvallen van olijven.

Damp het chloroform in een stikstofstroom in tot droog en weeg in dezelfde kolf nauwkeurig ongeveer 5 g af van het gedroogde gefiltreerde monster.
 - 5.1.2. Voeg 50 ml 2 N ethanolische kaliumhydroxideoplossing toe, bevestig de refluxkoeler en verhit tot zachtjes koken op een waterbad onder voortdurend krachtig schudden totdat de verzeeping 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.
 - 5.1.3. Breng de inhoud van de kolf kwantitatief over in een 500 ml scheitrechter, waarbij de kolf meerdere keren wordt gespoeld met gedistilleerd water tot in totaal ongeveer 50 ml. Voeg ongeveer 80 ml diëthylether toe, schud krachtig gedurende ongeveer 30 seconden en laat uitzakken (zie opmerking 1).

Tap de waterige onderlaag af in een tweede scheitrechter. Herhaal de extractie van de waterlaag twee keer op dezelfde manier en gebruik hierbij telkens 60-70 ml ethylether.

Opmerking 1: Eventuele emulsies kunnen worden vernietigd door met een pipet kleine hoeveelheden ethylalcohol of methylalcohol toe te voegen.
 - 5.1.4. Verzamel de etherextracten in een scheitrechter en was met telkens 50 ml gedistilleerd water totdat het waswater neutraal reageert.

Verwijder het waswater, droog met watervrij natriumsulfaat en filtreer over watervrij natriumsulfaat in een van tevoren gewogen 250 ml kolf,

▼ **M19**

was de trechter en het filter na met kleine hoeveelheden diëthylether. Er mag ook gebruik worden gemaakt van 1-eneicosanol.

- 5.1.5. Distilleer de ether tot op enkele ml af, droog door toepassing van een kleine onderdruk of in een stikstofstroom, voltooi het droogproces in een oven bij 100 °C gedurende ongeveer een kwartier, laat afkoelen in een exsiccator en weeg.

5.2. **Scheiding van de alcoholfractie**

- 5.2.1. Bereiding van de basische platen: dompel de kiezelgelplaten (4.4) gedurende 10 seconden volledig in de 0,2 N ethanolische kaliumhydroxideoplossing (4.5), 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 (de op deze manier bereide platen moeten binnen twee weken worden gebruikt).

Opmerking 2: Bij gebruik van basischekiezelgelplaten voor de scheiding van de alcoholfractie is de behandeling van het onverzeepbare residu met aluminiumoxide niet nodig. Met deze werkwijze worden alle zure stoffen (vetzuren en andere) vastgehouden op de startlijn en is de band van de alifatische- en terpeenalcoholen duidelijk van de sterolband gescheiden.

- 5.2.2. Breng in de ontwikkeltank een mengsel van hexaan/ethylether, 65:35 (v/v), tot een hoogte van ongeveer 1 cm (*).

Sluit de tank af met een geschikt deksel en laat hem gedurende ongeveer een half uur staan 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.

- 5.2.3. Bereid een ongeveer 5 %-oplossing van het onverzeepbare residu (5.1.5) in chloroform en breng hiervan met behulp van de 100 µl injectiespuit 0,3 ml aan op 2 cm van de zijkant van de chromatografische plaat (5.2.1) in een vloeiende lijn, die zo dun en uniform mogelijk moet zijn. Breng aan één eind van de plaat op dezelfde hoogte tevens 2-3 µl aan van de alcoholreferentieoplossing (4.11) zodat de alcoholband na de ontwikkeling kan worden geïdentificeerd.

- 5.2.4. Plaats de plaat in de volgens punt 5.2.2 voorbehandelde ontwikkeltank. De omgevingstemperatuur dient te liggen tussen 15 °C en 20 °C. Sluit de tank onmiddellijk af met het deksel en laat elueren totdat het vloeistoffront tot ongeveer 1 cm van de bovenkant van de plaat is gekomen.

Verwijder de plaat uit de tank en laat de loopvloeistof in een heteluchtstroom of door de plaat gedurende korte tijd in een zuurkast te drogen, verdampen.

- 5.2.5. Besproei de plaat licht en uniform met de 2,7-dichloorfluoresceïneoplossing. De alifatische alcoholenband kan door bekijken onder ultraviolet licht worden geïdentificeerd aangezien deze op dezelfde hoogte ligt als de vlek van de referentieoplossing. Markeer de grenzen van deze band en van de band direct hierboven, die correspondeert met de triterpeenalcoholen, aan de zijkanten van de fluorescentie met een zwart potlood.

Opmerking 4: Het voorschrift om zowel de alifatische alcoholenband als de triterpeenalcoholband samen verder te verwerken, houdt verband met het feit dat aanzienlijke hoeveelheden alifatische alcoholen bij deze methode in de triterpeenalcoholband terechtkomen.

- 5.2.6. Schraap met een metalen spatel de kiezelgel in het gemarkeerde gebied af. Breng het afgeschraapte, fijngemaakte materiaal over in de filterkroes (3.7). Voeg 10 ml hete chloroform toe, meng zorgvuldig met de

(*) In het bijzonder in deze gevallen dient een eluentmengsel benzeen/acetone 95:5 (v/v) te worden gebruikt om een goede scheiding in banden te verkrijgen.

▼ **M19**

metalen spatel en filtreer onder vacuüm. Verzamel het filtraat in de afzuigkolf (3.8), verbonden aan de filterkroes.

Was het residu in de filterkroes driemaal met ethylether (telkens ongeveer 10 ml), vang het filtraat op in dezelfde kolf. Damp het filtraat in tot een volume van 4-5 ml, breng de resterende oplossing over in de van tevoren gewogen 10 ml centrifugebuis (3.9), damp droog door voorzichtige verwarming in een zachte stikstofstroom, voeg enkele druppels aceton toe, damp weer droog, plaats de buis gedurende ongeveer tien minuten in een oven bij 105 °C, laat afkoelen in een exsiccator en weeg.

Het in de centrifugebuis aanwezige materiaal is de alcoholfractie.

5.3. **Bereiding van de trimethylsilylethers**

- 5.3.1. Voeg aan de in de centrifugebuis aanwezige alcoholfractie een hoeveelheid silyleringsreagens toe, bestaande uit een mengsel van pyridine/hexamethylsilazaan/trimethylchloorsilaan 9:3:1 (v/v/v) (zie opmerking 5), waarbij voor elke mg alcohol 50 µl wordt toegevoegd. Vermijd hierbij bevochtiging (zie opmerking 6).

Opmerking 5: Deze oplossing is kant en klaar in de handel verkrijgbaar. Andere silyleringsreagentia zijn ook bruikbaar, zoals bijvoorbeeld bistrimethylsilyltrifluoracetamide + 1 % trimethylchloorsilaan, hetgeen moet worden verdund met een gelijk volume watervrije pyridine.

Opmerking 6: De lichte opaalachtige weerschijn die kan worden gevormd, is normaal en veroorzaakt geen storing. 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.

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

5.4. **Gaschromatografische analyse**

- 5.4.1. Voorbereidende werkzaamheden, conditionering van de kolom

- 5.4.1.1. Bevestig de kolom in de gaschromatograaf, waarbij het inlaatstuk wordt aangesloten aan het splitsysteem met injector en het uiteinde aan de detector. Voer de gebruikelijke controle uit van het gaschromatografische systeem (lekkers in de gasvoorziening, detectorefficiëntie, efficiëntie van het splitsysteem en van het recordersysteem, enz.).

- 5.4.1.2. Indien de kolom voor de eerste keer wordt gebruikt, dient hij geconditioneerd te worden. 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 (zie opmerking 7). Houd deze temperatuur aan gedurende ten minste twee uur, stel vervolgens de hele apparatuur in gebruik (regeling van de gassnelheid en het splitsysteem, onsteking van de vlam, aansluiting van de elektronische recorder, temperatuurregeling 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 uitgevoerde conditionering van de kolom.

Opmerking 7: De temperatuur van het conditioneren moet altijd ten minste 20 °C lager zijn dan de maximumtemperatuur die voor de gebruikte stationaire fase is aangegeven.

- 5.4.2. Keuze van de werkomstandigheden

- 5.4.2.1. Als richtlijn voor de werkomstandigheden kunnen de volgende waarden dienen:

- kolomtemperatuur: acht minuten isotherm op 180 °C, opwarmen met 5 °C per minuut tot 260 °C, gedurende vijf minuten handhaven, afkoelen tot 160 °C en deze temperatuur vijf minuten handhaven;
- injectietemperatuur: 280 °C;

▼ **M19**

- detectortemperatuur: 290 °C;
- lineaire snelheid van het draaggas: helium 20-35 cm/s, waterstof 30-50 cm/s;
- splitverhouding: van 1:50 tot 1:100;
- gevoeligheid: vier tot 16 keer de minimumverzwakking;
- gevoeligheid van de recorder: 1-2 mV volle schaaluitslag;
- papersnelheid: 30-60 cm/uur;
- injectiehoeveelheid: 0,5-1 µl TMSE-oplossing.

Deze richtlijnen dienen afhankelijk van de karakteristieken van de kolom en de gaschromatograaf zodanig te worden gekozen dat chromatogrammen worden verkregen die aan de volgende eisen voldoen:

- de retentietijd van de C₂₆-alcohol moet ongeveer 18 ± vijf minuten zijn;
- de piek van de C₂₂-alcohol moet de volgende grootte hebben: voor olijfolie 80 ± 20 % volle schaaluitslag en voor zaadoliën 40 ± 0 % volle schaaluitslag.

5.4.2.2. Voer, om de hierboven genoemde vereisten te controleren, een aantal injecties uit van oplossingen van TMSE-alcoholen en pas de omstandigheden zodanig aan dat de beste resultaten worden verkregen.

5.4.2.3. De piek-integratieparameters moeten zodanig worden gekozen dat een juiste waarde van de piekoppervlakten wordt verkregen.

5.4.3. Bepaling

5.4.3.1. Zuig in de 10 µl-injectiespuit 1 µl hexaan, 0,5 µl lucht en ten slotte 0,5-1,0 µl monsteroplossing. Trek de plunjer van de spuit zover uit dat de naald leeg is. Penetreer met de naald het membraan van de injectie-eenheid en injecteer snel na één tot twee seconden, verwijder daarna voorzichtig na ongeveer vijf seconden de naald.

5.4.3.2. Neem het chromatogram op totdat alle aanwezige TMSE-alcoholen volledig zijn geëluëerd. De basislijn moet blijven voldoen aan de vereiste specificaties (5.4.1.2).

5.4.4. Identificatie van de pieken

Identificeer de individuele pieken op basis van de retentietijden en door vergelijking met mengsels van TMSE-alcoholen die onder dezelfde omstandigheden zijn geanalyseerd.

In figuur 1 wordt een chromatogram getoond van de alcoholfractie van een eerste persing olijfolie.

5.4.5. Berekening

5.4.5.1. Bereken met de integrator de piekoppervlakten van 1-eicosanol en de C₂₂-C₂₈ alifatische alcoholen.

5.4.5.2. Bereken het gehalte aan elke individuele alifatische alcohol in mg/1 000 g vethoudend materiaal als volgt:

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

waarbij:

A_x = piekoppervlak van alcohol x;

A_s = piekoppervlak van 1-eicosanol;

m_s = gewicht van het toegevoegde 1-eicosanol, in mg;

m = gewicht van het monster voor de bepaling, in g.

6. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Geef de gehalten van de individuele alifatische alcoholen op in mg/1 000 g vethoudend materiaal en hun som als „totaal alifatische alcoholen”.

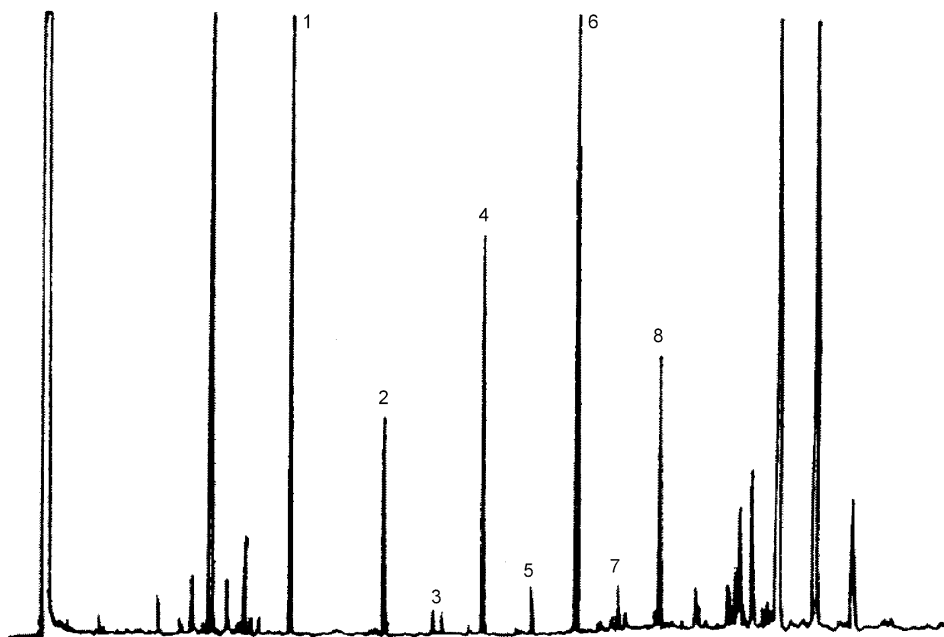
▼ **M19**

AANHANGSEL

Bepaling van de lineaire snelheid van het draaggas

Injecteer 1-3 µl methaan (of propaan) in de onder normale omstandigheden werkende gaschromatograaf en meet de tijd die deze stof nodig heeft om door de kolom te gaan vanaf het moment van injectie tot het verschijnen van de piek (tM).

De lineaire snelheid van het draaggas in cm/s wordt gegeven door L/tM , waarbij L de lengte is van de kolom in centimeters en tM de gemeten tijd in seconden.



Grafiek 1 — Chromatogram van de alcoholfractie van olie van de eerste persing

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