VERORDENING (EEG) Nr. 1058/77 VAN DE COMMISSIE

van 18 mei 1977

betreffende de kenmerken van olijfolie en van sommige produkten welke olijfolie bevatten en houdende wijziging van de nomenclatuur van het gemeenschappelijk douanetarief met betrekking tot olijfolie

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. 1707/73 (2), en met name op de artikelen 13, lid 4, en 18, lid 3,

Gelet op Verordening nr. 162/66/EEG van de Raad van 27 oktober 1966 betreffende het handelsverkeer in oliën en vetten tussen de Gemeenschap en Griekenland (3), en met name op artikel 3, lid 4, en artikel 9,

Gelet op Verordening (EEG) nr. 443/72 van de Raad van 29 februari 1972 betreffende de heffingen op olijfolie welke aan een raffinageproces onderworpen is geweest, alsmede op sommige produkten welke olijfolie bevatten (4), en met name op artikel 8,

Overwegende dat momenteel alle bij de eerste persing verkegen olijfolie behoort tot onderverdeling A II a) van post 15.07 van het gemeenschappelijk douanetarief; dat hierdoor voor deze produkten slechts één heffing wordt vastgesteld; dat, om het met de invoerheffing beoogde doel te bereiken, deze heffing moet worden vastgesteld naar gelang van de verschillende soorten bij de eerste persing verkregen olijfolie en dat daartoe de olijfoliën moeten worden onderscheiden naar hun fysische en chemische kenmerken; dat derhalve de nomenclatuur van het gemeenschappelijk douanetarief moet worden aangepast;

Overwegende dat de uit de toepassing van Verordening nr. 136/66/EEG voortvloeiende tariefnomenclatuur voorkomt in het gemeenschappelijk douanetarief dat als bijlage is gevoegd bij Verordening (EEG) nr. 950/68 (5), laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 874/77 (6);

Overwegende dat voor een juiste toepassing van de regeling inzake heffingen bij de invoer van afvallen van olijven een uniforme methode voor het bepalen van het oliegehalte van deze produkten moet worden vastgesteld;

Overwegende dat Verordening (EEG) nr. 618/72 van de Commissie van 29 maart 1972 betreffende de kenmerken van olijfolie en van sommige produkten welke olijfolie bevatten (7) meermaals is gewijzigd, met name bij Verordening (EEG) nr. 3366/75 (8); dat het, gezien de aan te brengen nieuwe wijzigingen, dienstig is de betrokken verordening in te trekken en alle bepalingen in een nieuwe verordening op te nemen;

Overwegende dat de in deze verordening vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Comité van beheer voor oliën en vetten,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

1. Als olijfolie in de zin van onderverdeling A van post 15.07 van het gemeenschappelijk douanetarief wordt enkel aangemerkt de olie uitsluitend afkomstig van de behandeling van olijven, met uitzondering van opnieuw veresterde olijfolie en van alle mengsels van olijfolie met olie van een andere soort.

De aanwezigheid van opnieuw veresterde olijfolie of van olie van een andere soort wordt aangetoond aan de hand van de in bijlage VII, respectievelijk VIII omschreven methoden.

2. Onder de onderverdelingen A I a), A I b) en A I c) van post 15.07 van het gemeenschappelijk douanetarief vallen de oliën die de in bijlage I, punten 1, 2 en 3, genoemde kenmerken vertonen. Deze kenmerken worden bepaald volgens de in de bijlagen IV, V en VI omschreven methoden.

3. Onder onderverdeling A II a) van post 15.07 van het gemeenschappelijk douanetarief vallen de oliën met de in bijlage I, punt 4, vermelde kenmerken.

4. De produkten van post 15.17 die de in bijlage II genoemde kenmerken vertonen, vallen niet onder onderverdeling A van post 15.17.

Artikel 2

1. Het gehalte aan olijfolie van perskoeken van olijven en andere bij de winning van olijfolie verkregen afvallen van onderverdeling A van post 23.04 wordt bepaald volgens de in bijlage IX omschreven methode.

(1) PB nr. 172 van 30. 9. 1966, blz. 3025/66.
(2) PB nr. L 175 van 29. 6. 1973, blz. 5.
(3) PB nr. 197 van 29. 10. 1966, blz. 3393/66.
(4) PB nr. L 54 van 3. 3. 1972, blz. 3.
(5) PB nr. L 172 van 22. 7. 1968, blz. 1.
(6) PB nr. L 106 van 29. 4. 1977, blz. 20.
(7) PB nr. L 78 van 31. 3. 1972, blz. 5.
(8) PB nr. L 333 van 30. 12. 1975, blz. 13.

2. Het in lid 1 bedoelde gehalte aan olijfolie wordt uitgedrukt in gewichtspercenten berekend over de droge stof.

Artikel 3

Het als bijlage bij Verordening (EEG) nr. 950/68 gevoegde gemeenschappelijk douanetarief wordt als volgt gewjzigd :

1. In de Aanvullende Aantekening nr. 1 op Hoofdstuk 15 wordt „post 15.07" vervangen door „onderverdeling D van post 15.07".
2. De Aanvullende Aantekeningen 2, 3 en 4 op Hoofdstuk 15 worden vervangen door de in bijlage III bij deze verordening opgenomen Aanvullende Aantekeningen 2, 3 en 4.
3. Onderverdeling A van post 15.07 wordt gelezen :

Nr.	Omschrijving	Invoerrecht	
		autonoom % of heffing (H)	conventioneel %
1	2	3	4
15.07	A. Olijfolie :		
	I. niet behandeld :		
	a) Olijfolie verkregen bij eerste persing	20 (H)	—
	b) Olijfolie verkregen bij eerste persing, voor verlichting (lampolie)	20 (H)	—
	c) andere	20 (H)	—
	II. andere :		
	a) verkregen uit oliën van de onderverdelingen A I a) of A I b) van post 15.07, ook indien versneden met olijfolie verkregen bij de eerste persing	20 (H)	—
	b) overige	20 (H)	—

Artikel 4

In alle communautaire besluiten moeten de verwijzingen naar de onderverdelingen A II, respectievelijk A I a) en b) van post 15.07 van het gemeenschappelijk douanetarief naar gelang van de kenmerken van het betrokken produkt worden gelezen als verwijzingen naar onderverdelingen A I a), b) en c), respectievelijk A II a) en b) van post 15.07 van het gemeenschappelijk douanetarief.

Artikel 5

Verordening (EEG) nr. 618/72 van de Commissie van 29 maart 1972 wordt ingetrokken.

Artikel 6

Deze verordening treedt in werking op de 43e dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen.*

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

Gedaan te Brussel, 18 mei 1977.

Voor de Commissie

De Vice-Voorzitter

Finn GUNDELACH

BIJLAGEN

Inhoud

		Blz.
BIJLAGE I :	Kenmerken van olijfolie	9
BIJLAGE II :	Produkten van post 15.17 A	10
BIJLAGE III :	Aanvullende Aantekeningen 2, 3 en 4 op Hoofdstuk 15 van het gemeenschappelijk douanetarief	10
BIJLAGE IV :	I. Behandeling van het monster met geactiveerd aluminiumoxyde	12
	II. Neutralisering en ontkleuring van olijfolie in het laboratorium	12
BIJLAGE V :	Onderzoek naar de aanwezigheid van olie van afvallen van olijven in olijfolie	14
	A. methode van Bellier	14
	B. methode van Vizern gewijzigd	14
BIJLAGE VI :	Onderzoek op zepen door bepaling van de alcaliniteit	16
BIJLAGE VII :	Onderzoek naar de aanwezigheid van opnieuw veresterde oliën	16
BIJLAGE VIII :	Bepaling van andere oliën dan olijfolie door analyse van sterolfractie van vetstoffen	20
BIJLAGE IX :	Methode ter bepaling van het oliegehalte van afvallen van olijven	24

BIJLAGE I

KENMERKEN VAN OLIJFOLIE

1. Als „olijfolie verkregen bij de eerste persing" in de zin van onderverdeling A I a) van post 15.07 van het gemeenschappelijk douanetarief wordt aangemerkt natuurlijk olijfolie welke niet op andere wijze is verkregen dan langs zuiver mechanische weg (persen daaronder begrepen), met uitzonderling van alle mengsels met olijfolie die op een andere wijze is verkregen, met de volgende kenmerken :

   a) een gehalte aan vrije vetzuren, berekend als oliezuur, van ten hoogste 3 % ;

   b) een extinctiecoëfficiënt K_{270} (de extinctie van een oplossing van 1 gram olie in 100 ml isooctaan (2,2,4-trimethylpentaan) door een laag van 1 cm bij een golflengte van 270 nm) niet hoger dan 0,25 en, na behandeling van het monster over een kolom geactiveerd aluminiumoxyde, niet hoger dan 0,11 ;

   c) een variatie van de extinctiecoëfficiënt in de nabijheid van 270 nm niet hoger dan 0,01 ;

   Deze variatie wordt uitgedrukt door de formule :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

   waarin
   K_m de extinctiecoëfficiënt is bij de golflengte van het maximum van de absorptiecurve in de nabijheid van 270 nm en

   K_{m-4} en K_{m+4} de extinciecoëfficiënten zijn bij de golflengten die 4 nm korter, respectievelijk 4 nm langer zijn dan die van K_m ;

   d) negatieve reacties volgens de methode Bellier en de methode Vizern gewijzigd, opgenomen in bijlage V, punten A en B ;

   e) negatieve reactie bij onderzoek op zepen volgens de methode opgenomen in bijlage VI.

2. Als „olijfolie voor verlichting verkregen bij de eerste persing" (lampolie) in de zin van onderverdeling A I b) van post 15.07 wordt, ongeacht het zuurgehalte, aangemerkt olijfolie met de volgende kenmerken :

   a) een extinctiecoëfficiënt K_{270} hoger dan 0,25 welke na behandeling van het monster over een kolom geactiveerd aluminiumoxyde niet hoger is dan 0,11.

   Oliën met een gehalte aan vrije vetzuren, berekend als oliezuur, hoger dan 3 % kunnen na behandeling over een kolom geactiveerd aluminiumoxyde een extinctiecoëfficiënt K_{270} hebben hoger dan 0,11.

   In dat geval moeten zij, na neutralisering en ontkleuring in het laboratorium volgens de methode opgenomen in bijlage IV, de volgende kenmerken vertonen :

   — extinctiecoëfficiënt K_{270} niet hoger dan 1,10 en

   — een variatie van de extinctiecoëfficiënt in de nabijheid van 270 nm hoger dan 0,01 en niet hoger dan 0,16 ;

   b) negatieve reacties volgens de methode Bellier en de methode Vizern gewijzigd, opgenomen in bijlage V, punten A en B ;

   c) negatieve reactie bij onderzoek op zepen volgens de methode opgenomen in bijlage VI.

3. Als oliën behorende tot onderverdeling A I c) van post 15.07 van het gemeenschappelijk douanetarief worden met name aangemerkt oliën uit „afvallen van olijven" met de volgende kenmerken :

   a) een gehalte aan vrije vetzuren, berekend als oliezuur, hoger dan 3 % ;

   b) positieve reacties volgens de methode Bellier en de methode Vizern gewijzigd, opgenomen in bijlage V, punten A en B ;

   c) negatieve reactie bij onderzoek op zepen volgens de methode opgenomen in bijlage VI.

4. Als olijfolie behorende tot onderverdeling A II a) van post 15.07 van het gemeenschappelijk douanetarief wordt aangemerkt olijfolie die is verkregen door behandeling van olie van de onderverdelingen A I a) of A I b) van post 15.07, ook indien versneden met olijfolie verkregen bij de eerste persing, met de volgende kenmerken :

   a) een gehalte aan vrije vetzuren, berekend als oliezuur, van ten hoogste 3 % ;

   b) postitieve reactie bij onderzoek op zepen volgens de methode opgenomen in bijlage VI, of

— een extinctiecoëfficiënt K_{270} hoger dan 0,25 en niet hoger dan 1,10 en, na behandeling van het monster over een kolom geactiveerd aluminiumoxyde, hoger dan 0,11 en

— een variatie van de extinctiecoëfficiënt in de nabijheid van 270 nm hoger dan 0,01 en niet hoger dan 0,16 ;

Deze variatie wordt uitgedrukt door de formule :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

waarin

K_m de extinctiecoëfficiënt is bij de golflengte van het maximum van de absorptiecurve in de nabijheid van 270 nm

K_{m-4} en K_{m+4} de extinctiecoëfficiënten zijn bij de golflengten die 4 nm korter, respectievelijk 4 nm langer zijn dan die van K_m ;

c) negatieve reacties volgens de methode Bellier en de methode Vizern gewijzigd, opgenomen in bijlage V, punten A en B.

BIJLAGE II

PRODUKTEN VAN POST 15.17 A

Tot onderverdeling A van post 15.17 van het gemeenschappelijk douanetarief behoren niet :

a) afvallen afkomstig van de bewerking van vetstoffen, die olie bevatten waarvan het joodgetal, bepaald volgens de methode Wijs zonder katalysator, kleiner is dan 70 of groter dan 100 ;

b) afvallen, afkomstig van de bewerking van vetstoffen, die olie bevatten met een joodgetal tussen de 70 en 100, maar waarbij het oppervlak van de piek die overeenkomt met het retentievolume van bèta-sitosterol, bepaald als aangegeven in bijlage VIII minder beslaat dan 93 % van de totale oppervlakte van de sterolpieken.

BIJLAGE III

AANVULLENDE AANTEKENINGEN 2, 3 EN 4 OP HOOFDSTUK 15 VAN HET GEMEENSCHAPPELIJK DOUANETARIEF

2. A. Als olijfolie in de zin van onderverdeling A van post 15.07 wordt enkel aangemerkt de olie uitsluitend afkomstig van de behandeling van olijven, met uitzondering van opnieuw veresterde olijfolie en van alle mengsels van olijfolie met olie van een andere soort.

B. Wordt aangemerkt als niet-behandelde olijfolie, olie als gedefinieerd in de hierna volgende punten I, II en III.

I. Als „olijfolie verkregen bij de eerste persing" in de zin van onderverdeling A I a) van post 15.07 wordt enkel aangemerkt natuurlijke olijfolie welke niet op andere wijze is verkregen dan langs zuiver mechanische weg (persen daaronder begrepen), met uitzondering van alle mengsels met olijfolie die op een andere wijze is verkregen, met de volgende kenmerken :

a) een gehalte aan vrije vetzuren, berekend als oliezuur, van ten hoogste 3 % ;

b) een extinctiecoëfficiënt K_{270} (de extinctie van een oplossing van 1 gram olie in 100 ml iso-octaan (2,2,4-trimethylpentaan) door een laag van 1 cm bij een golflengte van 270 nm) niet hoger dan 0,25 en, na behandeling van het monster over een kolom geactiveerd aluminiumoxyde, niet hoger dan 0,11 ;

c) een variatie van de extinctiecoëfficiënt in de nabijheid van 270 nm niet hoger dan 0,01 ;

Deze variatie wordt uitgedrukt door de formule :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

waarin

K_m de extinctiecoëfficiënt is bij de golflengte van het maximum van de absorptiecurve in de nabijheid van 270 nm

K_{m-4} en K_{m+4} de extinctiecoëfficiënten zijn bij de golflengten die 4nm korter, respectievelijk 4 nm langer zijn dan die van K_m ;

d) negatieve reacties volgens de methode Bellier en de methode Vizern gewijzigd ;

e) negatieve reactie bij onderzoek op zepen.

II. Als „olijfolie voor verlichting verkregen bij de eerste persing" (lampolie) in de zin van onderverdeling A I b) van post 15.07 wordt, ongeacht het zuurgehalte, aangemerkt olijfolie met de volgende kenmerken :

a) een extinctiecoëfficiënt K_{270} hoger dan 0,25 welke na behandeling van het monster over een kolom geactiveerd aluminiumoxyde niet hoger is dan 0,11.

Oliën met een gehalte aan vrije vetzuren, berekend als oliezuur, hoger dan 3 % kunnen na behandeling over een kolom geactiveerd aluminiumoxyde een extinctiecoëfficiënt K_{270} hebben hoger dan 0,11. In dat geval moeten zij, na neutralisering en ontkleuring in het laboratorium, de volgende kenmerken vertonen :

— extinctiecoëfficiënt K_{270} niet hoger dan 1,10 en

— een variatie van de extinctiecoëfficiënt in de nabijheid van 270 nm hoger dan 0,01 en niet hoger dan 0,16.

b) negatieve reacties volgens de methode Bellier en de methode Vizern gewijzigd ;

c) negatieve reactie bij onderzoek op zepen.

III. Als oliën behorende tot onderverdeling A I c) van post 15.07 worden met name aangemerkt oliën uit „afvallen van olijven" met de volgende kenmerken :

a) een gehalte aan vrije vetzuren, berekend als oliezuur, hoger dan 3 % ;

b) positieve reacties volgens de methode Bellier en/of de methode Vizern gewijzigd ;

c) negatieve reactie bij onderzoek op zepen.

C. Als olijfolie behorende tot onderverdeling A II a) van post 15.07 wordt aangemerkt olijfolie die is verkregen door behandeling van olie van de onderverdelingen A I a) of A I b) van post 15.07, ook indien versneden met olijfolie verkregen bij de eerste persing, met de volgende kenmerken :

a) een gehalte aan vrije vetzuren, berekend als oliezuur, van ten hoogste 3 % ;

b) positieve reactie bij onderzoek op zepen of :

— een extinctiecoëfficiënt K_{270} hoger dan 0,25 en niet hoger dan 1,10 en, na behandeling van het monster over een kolom geactiveerd aluminiumoxyde hoger dan 0,11 en

— een variatie van de extinctiecoëfficiënt in de nabijheid van 270 nm hoger dan 0,01 en niet hoger dan 0,16 ;

Deze variatie wordt uitgedrukt door de formule :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

waarin

K_m de extinctiecoëfficiënt is bij de golflengte van het maximum van de absorptiecurve in de nabijheid van 270 nm

K_{m-4} en K_{m+4} de extinctiecoëfficiënten zijn bij de golflengten die 4 nm korter, respectievelijk 4 nm langer zijn dan die van K_m ;

c) negatieve reacties volgens de methode Bellier en de methode Vizern gewijzigd.

3. Tot onderverdeling A van post 15.17 behoren niet :

   a) afvallen, afkomstig van de bewerking van vetstoffen, die olie bevatten waarvan het joodgetal, bepaald volgens Wijs zonder katalysator, kleiner is dan 70 of groter dan 100,

   b) afvallen, afkomstig van de bewerking van vetstoffen, die olie bevatten met een joodgetal tussen 70 en 100, maar waarbij het oppervlak van de piek die overeenkomt met het retentievolume van bèta-sitosterol, bepaald als aangegeven in bijlage VIII van de hierna onder Aanvullende Aantekening 4 genoemde verordening minder beslaat dan 93 % van de totale oppervlakten van de sterolpieken.

4. Voor de vaststelling van de kenmerken van bovengenoemde produkten worden de analysemethoden gebruikt die zijn beschreven in de bijlagen bij Verordening (EEG) nr. 1058/77.

BIJLAGE IV

I. BEHANDELING VAN HET MONSTER OVER EEN KOLOM GEACTIVEERD ALUMINIUMOXYDE

1. Breng 30 g basisch aluminiumoxyde, verkregen volgens de in paragraaf 2 beschreven wijze, in een chromatografiekolom van ongeveer 35 mm doorsnede en 450 mm lengte, met een uitloop van ongeveer 10 mm doorsnede.

   Druk van aluminiumoxyde samen door de kolom in vertikale stand herhaaldelijk en zachtjes te laten vallen op een houten oppervlak. Giet op de aldus voorbereide kolom 100 ml van een oplossing van 10 % olie en hexaan.

   Vang het eluaat op en damp het oplosmiddel onder vacuüm af bij een temperatuur beneden 25 °C.

   Van de aldus verkregen olie moet de extinctiecoëfficiënt bij 270 nm onmiddellijk worden bepaald.

2. Men verkrijgt basisch aluminiumoxyde met een activiteit I volgens Brockmann (0 % water) door basisch aluminiumoxyde (voor chromatografie) met een korrelgrootte tussen 30 en 130 µm (gemiddeld 80 µm) gedurende drie uur op 380-400 °C te verhitten.

   Ten einde basisch aluminiumoxyde met een activiteit volgens Brockmann tussen II en III te verkrijgen, voegt men aan 100 g van het produkt met activiteit I 5 ml gestistilleerd water toe. Schud herhaaldelijk en laat gedurende een nacht in een hermetisch gesloten vat staan.

   Controle van de activiteit van het aluminiumoxyde

   Breng 30 g basisch aluminiumoxyde (verkregen op de hierboven beschreven wijze) in een chromatografiekolom van ongeveer 35 mm doorsnede en 450 mm lengte ; laat onder de in de methode genoemde voorwaarden door de kolom een mengsel lopen, bestaande uit 95 % olijfolie van de eerste persing met een extinctiecoëfficiënt K_{270} lager dan 0,18 en 5 % aardnotenolie, die tijdens de raffinage is behandeld met bleekaarde, met een extinctiecoëfficiënt K_{270} niet lager dan 4. Bij een extinctiecoëfficiënt van het mengsel hoger dan 0,11 is het aluminiumoxyde bruikbaar. Indien met het aluminiumoxyde geen elutie van geconjugeerde triënen plaats vindt, moet een aluminiumoxyde met een hoger vochtgehalte worden gebruikt, nadat is nagegaan dat dit aan de eisen van de hiervoor beschreven proef voldoet.

II. NEUTRALISERING EN ONTKLEURING VAN OLIJFOLIE IN HET LABORATORIUM

A. NEUTRALISERING VAN DE OLIJFOLIE

1. **Apparatuur**

   — hoog bekerglas van 300 ml ;
   — laboratoriumcentrifuge met buisjes van 100 ml ;
   — bekerglas van 250 ml ;
   — kolven van 100 ml ;
   — scheitrechter van 1 liter.

2. **Reagentia**

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

3. **Werkwijze**

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

Breng in een hoog bekerglas 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 zeeppasta af. Giet de geklaarde olie af in een bekerglas 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 fenolftaleïne 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 scheitrechter 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 laten 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 fenolftaleïne geen rose kleuring meer geeft.

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

B. ONTKLEURING VAN DE GENEUTRALISEERDE OLIE

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 ;
c) een aansluiting voor de vacuümpomp ;

— vacuümpomp, in staat een resterende druk te geven van 15-30 mbar, en voorzien van een manometer.

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, warmen 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 bleekaarde 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).

BIJLAGE V

ONDERZOEK OP AANWEZIGHEID VAN OLIE UIT AFVALLEN IN OLIJFOLIE

A. METHODE VAN BELLIER

1. **Toestellen**

— kolf van 100 ml, voorzien van een terugvloeikoeler;

— pipet van 5 ml met schaalverdeling in tienden;

— verwarmingstoestel waarmede de kolf op een temperatuur van ongeveer 80 °C kan worden gebracht;

— thermometer van 15 tot 60 °C.

2. **Reagentia**

— kaliumhydroxydeoplossing in water en alcohol (42,5 g KOH opgelost in 72 ml gedistilleerd water, vervolgens aangevuld tot 500 ml met ethylalcohol 95 %);

— ethanol 70 %;

— oplossing van 1 volumedeel azijnzuur in 2 volumedelen water, bereid op zodanige wijze dat 1,5 ml precies 5 ml van de kaliumhydroxydeoplossing in water en alcohol in aanwezigheid van fenolftaleïne neutraliseren.

3. **Bereiding van het monster**

Het water wordt uit de olie verwijderd door afschenken en filtreren over filtreerpapier bij een temperatuur die iets hoger ligt dan het smeltpunt van sommige vastgeworden bestanddelen, die zich eventueel uit de vloeibare olie hebben afgescheiden.

4. **Werkwijze**

Breng in de kolf ongeveer 1 ml olie, behandeld als aangegeven in paragraaf 3 en voeg hieraan 5 ml van de oplossing van kaliumhydroxyde in water en alcohol toe. Breng de terugvloeikoeler aan, laat gedurende 10 minuten koken en schud bij tussenpozen. Laat afkoelen tot kamertemperatuur.

Voeg 1,5 ml van de oplossing van azijnzuur in water toe, alsmede 50 ml van de ethylalcoholoplossing die vooraf is verwarmd tot 50 °C. Meng door roeren, breng de thermometer in en laat afkoelen; neem het uiterlijk van de oplossing waar zodra deze een temperatuur van 45 °C bereikt.

Indien een vlokkige neerslag ontstaat bij een temperatuur boven 40 °C is de reactie positief. Bij afwezigheid van een dergelijke vlokkige neerslag moet de vloeistof gedurende ten minste 24 uur en zo nodig gedurende 48 uur worden bewaard bij kamertemperatuur, die moet liggen tussen 20 en 22 °C. Controleer de oplossing alsdan nogmaals: het ontstaan van een vlokkig neerslag dat in de vloeistof zweeft geeft eveneens aan dat de reactie positief is.

Weergave van de resultaten

Onderzoek naar de aanwezigheid van olie uit afvallen (methode volgens Bellier) positief of negatief.

B. METHODE VIZERN GEWIJZIGD

Het onverzeepbare deel van de te onderzoeken olie wordt afgescheiden en een oplossing hiervan in 85 % alcohol wordt onder de voorgeschreven omstandigheden onderzocht.

1. **Toestellen**

— Kolven van 300 ml van alcalibestendig glas, voorzien van een terugvloeikolf;

— Scheitrechters van 500 of 1 000 ml

— Bekerglazen van 100 ml

— Reageerbuizen (glas)

2. **Reagentia**

— Kaliumhydroxydeoplossing in ethalnol, 2 N
— Petroleumether
— Ethanol 50 %
— Ethanol 96 %
— Waterstofperoxyde 10 %
— Ethanol 85 %

3. **Werkwijze**

Breng ongeveer 5 g van het te onderzoeken monster in een kolf van 300 ml. Voeg 50 ml alcoholische kaliumhydroxydeoplossing 2 N toe. Plaats de terugvloeikoeler op de kolf, laat gedurende 1 uur zacht koken en schud. Koel af tot 30 à 35 °C. Voeg 50 ml gedistilleerd water toe en breng over in een scheitrechter.

Spoel de kolf zorgvuldig met 50 ml petroleumether en herhaal dit enige malen. Breng de petroleumether in een scheitrechter.

Schud de inhoud gedurende ruim een minuut krachtig. Breng na scheiding van de lagen de waterlaag over in een tweede scheitrechter. Voeg nogmaals 50 ml petroleumether toe, schud krachtig en laat scheiden. Breng vervolgens de waterlaag over in een derde scheitrechter en voeg nogmaals 50 ml petroleumether toe. Schud krachtig en wacht tot scheiding van de lagen heeft plaatsgevonden.

Voeg de petroleumetherextracten, die bij de verschillende extracties van de onverzeepbare rest werden verkregen, samen en breng over in een scheitrechter. Was ten minste driemaal met 50 % alcohol (50 ml per keer) tot de wasvloeistof geen alcalische reactie meer geeft met fenolftaleïne.

Filtreer de oplossing van de onverzeepbare rest in een kolf van 300 ml, was het filter na met petroleumether en verwijder het oplosmiddel door distillatie. Voeg 10 ml 96 %ige alcohol toe, en filtreer na voorzichtig verwarmen (bij ongeveer 40 °C) in een bekerglas van 100 ml. Was het bekerglas van 300 ml na met 10 ml 96 %ige alcohol en breng deze hoeveelheid vervolgens eveneens via het filter over in het tweede bekerglas.

Voeg aan de alcoholextracten van de onverzeepbare rest in het bekerglas van 100 ml 5 ml waterstofperoxydeoplossing (10 %) toe. Damp de oplossing op een waterbad tot droog in. Voeg 20 ml 96 %ige alcohol en 5 ml waterstofperoxydeoplossing (10 %) toe en damp wederom tot droog in.

Neem het bekerglas van het waterbad en voeg 20 ml 85 %ige alcohol toe. Verwarm de oplossing voozichtig op een waterbad en let daarbij goed op dat geen alcoholverlies optreedt ten einde de concentratie niet te verlagen. Dit is van zeer groot belang.

Filtreer de oplossing over een papierfilter en koel af. Ga na 1 uur, respectievelijk na 4 uur het uiterlijk van de oplossing na. Indien de oplossing na een uur volkomen helder is, dient het onderzoek als negatief te worden beschouwd in die zin dat er geen olie van afvallen aanwezig is. Indien na 1 uur wel troebelingen in de oplossing waarneembaar zijn, wordt de waarneming na 4 uur herhaald.

Indien na verloop van 4 uur de oplossing nog troebel is doch zich geen vlokvorming voordoet dient het onderzoek nog als negatief te worden beschouwd. Indien daarentegen na 4 uur vlokken zijn gevormd is het onderzoek positief in die zin dat olie van afvallen aanwezig is.

Weergave van de resultaten

Onderzoek naar de aanwezigheid van olie van afvallen (methode Vizern gewijzigd):

positief of negatief.

Opmerkingen

Olijfolie geeft een heldere of hoogstens een enigszins opaliserende oplossing gedurende de gehele proef. Olie van afval vormt, alleen of gemengd met andere olie, karakteristieke vlokken die als wolkjes in suspensie blijven en na enkele uren bezinken.

BIJLAGE VI

ONDERZOEK OP DE AANWEZIGHEID VAN ZEPEN, TER AANTONING VAN DE ALKALITEIT

Beginsel van de methode

aantonen van alkalische zepen door reactie met broomfenolblauw.

Reagentia

— broomfenolblauw, 0,1 % oplossing in ethanol 96 %

— aceton vers gedistilleerd, waaraan 2 % water is toegevoegd.

De aceton met 2 % water moet in aanwezigheid van enkele druppels van de broomfenolblauwoplossing geel of geelgroen gekleurd zijn.

Toestellen

Reageerbuis van 150 mm × 15 mm (bij voorkeur met ingeslepen stop).

Werkwijze

Breng in de reageerbuis 10 ml aceton en 1 druppel broomfenoloplossing. De kleur moet omslaan naar geel. Is dit niet het geval, was de reageerbuis en stop met aceton tot de blauwe kleur is verdwenen. Breng 10 g olie in de buis. Sluit met behulp van een schone stop, schud en zet weg. Een omslaan van de kleur in de bovenlaag van de aceton naar blauw wijst op de aanwezigheid van zeep.

Weergave van de resultaten

Het resultaat wordt weergegeven als positief of negatief.

BIJLAGE VII

ONDERZOEK NAAR DE AANWEZIGHEID VAN OPNIEUW VERESTERDE OLIËN

De methode heeft tot doel in oliën en vetten de samenstelling te bepalen van de vetzuren die op de 2-plaats van glycerol zijn veresterd (β-plaats of midden plaats); de opnieuw veresterde olijfoliën bevatten op de β-plaats meer palmitinezuur dan de niet veresterde olijfoliën.

Beginsel

Deze methode is gebaseerd op de partiële en specifieke hydrolyse van triglyceriden door pancreaslipase, waarbij zich bij voorkeur 2-monoglyceriden vormen. Deze hydrolyse leidt tot een mengsel dat naast niet-gehydrolyseerde triglyceriden, diglyceriden, 2-monoglyceriden en vrije vetzuren bevat. Dit mengsel wordt gescheiden door middel van dunne laagchromatografie, waarna de monoglyceriden worden afgezonderd. Uit deze monoglyceriden worden de methylesters der vetzuren bereid, die vervolgens gaschromatografisch worden onderzocht.

Aangenomen moet worden dat aan het onderzochte produkt opnieuw veresterde olie is toegevoegd indien het percentage aan palmitinezuur op de 2-plaats van de triglyceriden hoger is dan 2 %.

1. **Toestellen**

— scheitrechter van 500 ml

— glazen kolom voor chromatografie met een binnendiameter van 13 mm en een lengte van 400 mm, voorzien van een filter van gesinterd glas en een kraan,

— kolf, 250 ml met brede hals,

— kolf, 100 ml,

— centrifugebuisje van 10 ml met ingeslepen stop,

— injectiespuitje van 1 ml, met dunne naald,

— kolf van 25 ml met ingeslepen hals, voorzien van passende luchtkoeler, ongeveer 1 m lang,
— bekerglas van 50 ml,
— buret van 5 ml, met maatverdeling in 1/20 ml,
— uitstrijkapparaat voor dunnelaagchromatografie, met glasplaten van 20 × 20 cm,
— microspuitje voor druppels van 3-4 µl,
— ontwikkeltank voor dunnelaagchromatografie,
— rotatieverdamper,
— droogstoof instelbaar op 103 °C ± 2 °C,
— thermostaat die tussen 30 °C en 45 °C op ± 0,5 °C kan worden ingesteld,
— elektrische schudmachine waarmee het centrifugebuisje krachtig kan worden geschud,
— verstuiver voor dunnelaagchromatografie,
— UV-lamp voor onderzoek van dunnelaag platen,
— laboratoriumroerder, geschikt voor het dispergeren en mengen van heterogene materialen,
— pH-meter,
— mechanische roerder,
— chronometer.

2. **Reagentia**

— natriumhydroxyde, 12 %-oplossing (m/v) in water,
— fenolftaleïne, 1 %-oplossing (m/v) in 95 %-ethanol (v/v),
— diethylether, vrij van peroxyde,
— isopropanol of 95 %-ethanol (v/v) p.a.,
— aluminiumoxyde, geactiveerd voor chromatografie, neutraal, met activiteit I volgens Brockmann, vóór gebruik gedurende 2 uren geactiveerd bij 260 °C en in een exsicator bewaard,
— n-hexaan, of indien niet voorhanden petroleumether (kookpunt = 30 °C — 50 °C), voor chromatografie,
— mierezuur, ten minste 98 % (m/m),
— pancreaslipase met geschikte activiteit (opmerking 1, opmerking 2),
— bufferoplossing : oplossing van tris-hydroxymethylaminomethaan in water 1 M, door middel van zoutzuur 6 N op pH 8 gebracht (potentiometrische controle),
— natriumcholaat (voor enzymatische doeleinden), 0,1 %-oplossing (m/v) in water,
— zoutzuuroplossing 6 N,
— loopmiddel : hexaan, (of indien niet voorhanden petroleumether), diethylether, mierezuur 70/30/1 (v/v/v),
— arabische gom, 10 %-oplossing in water (m/v),
— calciumchloride ($CACl_2$), 22 %-oplossing (m/v) in water,
— dichloor-2'-7'-fluoresceïne, 0,2 oplossing in ethanol (m/v) enigszins alcalisch gemaakt door toevoeging van 1 druppel natriumhydroxyde 1 N per 100 ml,
— silicagel, met bindmiddel, voor dunnelaagchromatografie,
— natriumcholaat, 20 % oplossing (m/v) in water,
— natriumhydroxyde, oplossing in water 0,1 N,
— geneutraliseerde plantaardige olie.

3. **Bereiding van het monster**

Monster met een zuurgehalte van minder dan 3 % : directe neutralisering met behulp van aluminiumoxyde volgens 3-2.

Monster met een zuurgehalte van meer dan 3 % : neutralisering door alkali in aanwezigheid van een oplosmiddel volgens 3-1 gevolgd door behandeling met aluminiumoxyde volgens 3-2.

3.1. *Neutralisering door alkali in aanwezigheid van een oplosmiddel*

Breng in een scheitrechter van 500 ml ongeveer 10 g ruwe olie, 100 ml hexaan (of indien niet voorhanden petroleumether), 50 ml isopropanol of ethnaol 95°, enkele druppels fenolftaleïne-oplossing en een hoeveelheid 12 %ige natriumhydroxydeoplossing overeenkomende met de hoeveelheid vrij zuur in de olie plus een overmaat van 0,3 %. Schud gedurende 1 minuut krachtig, voeg 50 ml gedistilleerd water toe, schud opnieuw en laat staan.

Verwijder na scheiding van de lagen, de onderste laag met de zepen en eveneens eventuele tussenlagen (onoplosbare stoffen en slijmen). Was de hexaanoplossing van de geneutraliseerde olie met porties van 25 of 30 ml van een oplossing van isopropanol of ethanol en gedistilleerd water 1 : 1 (v/v) tot de rose verkleuring van het fenolftaleïne verdwenen is.

Damp het grootste gedeelde van het hexaan onder vacuüm af en droog de olie bij 30-40 °C onder vacuüm met behulp van een stroom zuivere stikstof totdat het oplosmiddel volledig is verwijderd.

3.2. *Behandeling met aluminiumoxyde*

Bereid een suspensie van 15 g geactiveerd aluminiumoxyde in 50 ml hexaan, of indien niet voorhanden petroleumether, bereiden en vul hiermee onder zwenken een regelmatige verdeling van het aluminiumoxyde in het oplosmiddel. Laat het oplosmiddel af tot 1-2 mm boven het niveau van het absorptiemiddel. Breng voorzichtig op de kolom een oplossing van 5 h olie in 25 ml hexaan, of indien niet voorhanden petroleumether, die circa 15 minuten van tevoren is bereid. Vang de uit de kolom stromende vloeistof in zijn geheel op in een 100 ml-kolf.

Verwijder het grootste gedeelte van het oplosmiddel door vacuümdistillatie, droog vervolgens de olie bij 30-40 °C onder vacuüm met behulp van een stroom zuivere stikstof totdat het oplosmiddel volledig is verwijderd.

4. **Bereiding van de dunnelaagplaten**

Breng in een 250 ml-kolf met brede hals 30 g silicagel met bindmiddel en 60 ml gedistilleerd water en roer tot een goed homogene brij is verkregen. Ontgas de brij onder vacuüm gedurende 1 minuut met behulp van een waterstraalluchtpomp.

Strijk de brij onder de gebruikelijke omstandigheden door middel van het uitstrijkapparaat op de platen uit in een laag met een dikte van 0,25 mm.

De bovenstaande hoeveelheid brij is voldoende voor de bereiding van 5 platen van 20 × 20 cm.

Droog de platen gedurende ongeveer 15 minuten aan de lucht en vervolgens gedurende 2 uren in een droogstoof bij 103 °C ± 2 °C.

Bewaar de aldus geprepareerde platen in een exsicator of geschikte droogkast.

5. **Werkwijze**

5.1. *Hydrolyse door Pancreaslipase*

Weeg in het centrifugebuisje van 10 ml ongeveer 0,1 g van het voorbehandelde monster.

Voeg 20 mg lipase en 2 ml bufferoplossing toe. Roer zorgvuldig en voorzichtig en voeg vervolgens 0,5 ml van de 0,1 %-oplossing van natriumcholaat en 0,2 ml van de 22 % calciumchlorideoplossing toe. Sluit het buisje met de ingeslepen stop, zwenk voorzichtig (zonder de stop nat te maken), breng het buisje onmiddellijk in de op 40 °C ± 0,5 °C ingestelde thermostaat en schud daarbij gedurende precies 1 minuut.

Neem het buisje uit de thermostaat en schud krachtig gedurende precies 2 minuten.

Laat dadelijk afkoelen in stromend water ; voeg 1 ml zoutzuur 6 N en 1 ml diethylether toe. Sluit af en schud krachtig. Laat staan en neem de bovenste laag op met behulp van een spuitje.

5.2. *Scheiding van de monoglyceriden door middel van dunnelaagchromatografie*

Breng het extract op de dunnelaagplaat op ongeveer 1,5 cm van de onderrand op in een doorlopende en gelijkmatige lijn, erop lettende dat een zo smal mogelijke startlijn wordt verkregen.

Plaats de plaat in de verzadigde ontwikkeltank en ontwikkel met het loopmiddel tot ongeveer 1 cm van de bovenrand bij een temperatuur van ongeveer 20 °C.

Droog de plaat aan de lucht bij dezelfde temperatuur als die van de tank en besproei daarna met de oplossing van dichloor-2'-7'-fluoresceïne. Baken de monoglycerideband (Rf = ong. 0,035) onder U ;V ;-licht af en krab deze vervolgens met een metalen spatel af (waarbij moet worden vermeden dat de op de startlijn achtergebleven bestanddelen worden meegenomen). Breng de silicagel over in de kolf van 25 ml, waarmee wordt gemethyleerd.

Zet de monoglyceriden om in methylesters der aanwezige vetzuren door de afgekrabde en in de kolf overgebrachte silicagel rechtstreeks te behandelen onder de omstandigheden als beschreven in de algemene methode voor de bereiding van de methylesters der vetzuren onder 7-3 en ga vervolgens over tot de gaschromatografische analyse van de esters volgens de methode aangeduid onder 7-4.

Bepaal aan het oorspronkelijke monster de totale vetzuursamenstelling waarvan de vergelijking met die van de vetzuren op de 2-plaats nodig is voor de interpretatie van de verkregen resultaten.

6. **Weergave van de resultaten**

Bereken de samenstelling van de vetzuren op de 2-plaats in procenten en geef deze aan tot op 1 decimaal (opmerking 3).

7. Opmerkingen

7.1. *Controle van de lipase-activiteit*

Bereid een olie-emulsie door gedurende ongeveer 10 minuten in een daartoe geschikt apparaat een mengsel te roeren bestaande uit 165 ml 10 %-ige oplossing van Arabische gom, 15 g fijn gestampt ijs en 20 ml vooraf geneutraliseerde olie.

Breng in een 50 ml-bekerglas achtereenvolgens 10 ml van de bovenstaande emulsie, 0,3 ml 20 %-ige natriumcholaatoplossing en 20 ml gedistilleerd water.

Plaats de beker in een op 37 °C ± 0,5 °C ingestelde thermostaat, vervolgens de elektroden van een pH-meter in de beker en roer met de mechanische roerder.

Voeg met behulp van een 5 ml buret druppelsgewijze 0,1 N natriumhydroxyde-oplossing toe tot een pH van 8,5 is bereikt.

Voeg een geschikte hoeveelheid van een suspensie van poedervormige lipase in water toe (zie hierna). Zet zodra de pH-meter een pH van 8,3 aangeeft, de chronometer aan en voeg met een snelheid die nodig is om de pH op 8,3 te houden, natriumhydroxyde-oplossing 0,1 N toe. Stel elke minuut het verbruikte volume van deze oplossing vast.

Verwerk de verkregen gegevens in een grafiek door de tijd op de abscis en het aantal ml laag-oplossing verbruikt om de pH constant te houden op de ordinaat uit te zetten. De verkregen grafiek moet lineair zijn.

De in bovenstaande paragraaf vermelde lipasesuspensie is een suspensie van 1 gewichtsprocent lipasepoeder in water. Neem voor elke proef een zodanige hoeveelheid suspensie dat ongeveer 1 ml laag-oplassing in 4 of 5 minuten wordt verbruikt. Dit resultaat wordt normaal met 1 à 5 mg poeder verkregen.

De lipase-eenheid wordt gedefinieerd als de hoeveelheid ensym die 10 µ-equivalent zuur per minuut vrijmaakt.

Activiteit A van het gebruikte poeder, gemeten in lipase-eenheden per mg :

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

waarin V = aantal ml 0,1 N natriumhydroxyde-oplossing per minuut, afgeleid uit de grafiek

m = gewicht van het monster lipasepoeder in mg.

Het gebruikte lipase moet een activiteit tussen 0,8 en 2 lipase-eenheden per mg hebben.

7.2. *Bereiding van lipase*

In de handel zijn lipasen met een voldoend hope lipaseactiviteit verkrijgbaar. Zij kunnen tevens in het laboratorium op de volgende wijze worden bereid :

Koel 5 kg verse varkenspancreas af tot 0 °C ; verwijder het omringende vaste vet en bindweefsel en maal in een molen fijn ten einde een vloeibare pasta te verkrijgen.

Roer deze pasta onder koeling gedurende 4 tot 6 uren met 2,5 liter watervij aceton, centrifugeer vervolgens en extraheer het residu nog dire maal met hetzelfde volume aceton, twee maal met een mengsel van aceton en diethylether 1/1 (v/v) en twee maal met diethylether.

Droog het residu gedurende 48 uur onder vacuüm ter verkrijging van een stabiel poeder, dat in de koelkast moet worden bewaard.

7.3. *Bereiding van methylesters van vetzuren*

Overeenkomstig de methode omschreven in bijlage VI, onder II, van Verordening (EEG) nr. 72/77 van de Commissie van 13 januari 1977 tot wijziging van Verordening (EEG) nr. 1470/68 betreffende het nemen en het omzetten van monsters alsmede betreffende het bepalen van het oliegehalte, het gehalte aan onzuiverheden en het vochtgehalte van oliehoudende zaden (1).

7.4. *Gaschromatografische analyse van de methylesters van vetzuren*

Overeenkomstig de methode omschreven in bijlage VI, onder III, van Verordening (EEG) nr. 72/77.

---

(1) PB nr. L 12 van 15. 1. 1977, blz. 11.

BIJLAGE VIII

ONDERZOEK VAN OLIJFOLIE OP AANWEZIGHEID VAN ANDERE OLIËN: ANALYSE VAN DE STEROLFRACTIE VAN VETTEN EN OLIËN

Beginsel

Gaschromatografische analyse van de sterolen, welke door middel van dunnelaagchromatografie uit de onverzeepbare rest werden afgescheiden, die voorzichtig werd gedroogd.

Toestellen

1. Apparatuur voor dunnelaagchromatografie, met name bestaande uit vier glasplaten van 20 × 20 × 0,4 cm en 2 van 20 × 5 × 0,4 cm en een microspuit van 0,1 ml;
2. Bekerglas van 50 ml;
3. Filterkroezen met poreusheid 3, doorsnede 15 mm;
4. Kolf van 100 ml;
5. Centrifugenbuisje van 10 ml met conische bodem en ingeslepen stop;
6. Pipetten van 1 ml met schaalverdeling;
7. Gaschromatograaf voorzien van een vlamionisatiedetector, met zilveren of glazen injectiesysteem of systeem voor directe injectie op de kolom en registreerapparatuur (recorder);
8. Kolom voor gaschromatografie van glas of roestvrij staal, U- of spiraalvormig met een lengte van 1 tot 2 meter en een binnendiameter van 3 tot 4 mm — stationaire fase van siliconrubber (methyltype [1]), stabiel tot ten minste 300 °C, 2 tot 4 % op gecalcineerde met zuur gewassen en gesilaniseerde diatomeeënaarde met korrelgrootte 80/100 of 100/120 mesh;

   Opmerking: Aangezien sommige soorten roestvrij staal foutieve resultaten kunnen veroorzaken door ontleding van de sterolen, wordt aanbevolen gebruik te maken van glas.
9. Microspuit waarmee hoeveelheden tot 5 of 10 µl kunnen worden geïnjecteerd.

Reagentia

1. Chloroform voor chromatografie;
2. Benzeen voor chromatografie;
3. Heptaan;
4. Silicagel (bij voorbeeld Kieselgel G);
5. Vergelijkingsoplossing voor dunnelaagchromatografie bestaande uit een oplossing van 5 % cholesterol in chloroform;
6. Aceton voor chromatografie;
7. Natriumzout van 2'7'-dichloorfluoresceïne, 0,1 % oplossing in absolute ethanol;
8. Pyridine;
9. Hexamethyldissilazaan;
10. Trimethylchloorsilaan;
11. Oplossing voor de gevoeligheidstest: 1 mg cholesterol in ml n-pentaan;
12. Oplossing voor de bepaling van het scheidend vermogen: 0,9 mg fytosterolen van raapolie en 0,1 mg cholesterol in ml n-pentaan. De sterolen moeten vers bereid zijn zoals beschreven in punt B van de werkwijze;
13. Oplossing voor de referentieproef: 1 mg fytosterolen van zonnebloemolie in 1 ml n-pentaan, vers bereid zoals omschreven in punt B van de werkwijze.

Bereiding van de platen voor dunnelaagchromatografie

Plaats in het uitstrijkapparaat achtereenvolgens een plaat van 20 × 5 × 0,4 cm, vier platen van 20 × 20 × 0,4 cm en een plaat van 20 × 5 × 0,4 cm.

[1] Bij voorbeeld SE 30.

Breng in een kolf van 500 ml met wijde hals 40 g silicagel en ongeveer 80 ml water. Roer met een glazen staaf, eventueel met een mechanische roerder, tot een homogene suspensie is verkregen. Verwijder eventuele ingesloten gassen door gedurende ten minste 1 minuut de kolf onder vacuüm te brengen met behulp van een waterstraalluchtpomp. Breng daarna de suspensie over in het uitstrijkapparaat, stel de dikte in op 0,5 mm en bedek de platen gelijkmatig.

Droog de platen gedurende ongeveer 15 minuten aan de lucht en vervolgens 2 uur in een droogstoof bij een temperatuur van 105 °C. Bewaar de aldus bereide platen in een exsicator onder vacuüm.

WERKWIJZE

A. Bereiding van de onverzeepbare rest

Inleiding

Onder de onverzeepbare rest worden verstaan de stoffen, die oplosbaar zijn in vetten en die na verzeping onoplosbaar zijn in water maar oplosbaar zijn in het oplosmiddel dat voor de bepaling wordt toegepast. Deze rest omvat de natuurlijke bestanddelen van de vetstoffen (zoals sterolen, alcoholen, koolwaterstoffen) alsmede de organische niet bij 100 °C vluchtige bestanddelen (zoals minerale oliën) die niet tot de vetten waarin zij eventueel kunnen voorkomen, behoren. Als oplosmiddel wordt gebruik gemaakt van petroleumether of van ethylether. Er moet rekening worden gehouden met het feit dat de resultaten die met beide oplosmiddelen worden verkregen in de meeste gevallen sterk uiteenlopen en dat met ethylether hogere gehalten worden gevonden dan met het andere oplosmiddel. Wat de olijfolie betreft wordt rekening houdende met de temperatuursomstandigheden in de meeste analyselaboratoria petroleumether als het beste oplosmiddel beschouwd.

Methode met petroleumether

Toestellen

Kolf van ongeveer 150 ml voorzien van een terugvloeikoeler;

Scheitrechters van ongeveer 500 ml;

Droogstoof afgesteld op 103 °C (± 2 °C).

Reagentia

Kaliumhydroxide, ca 2 N oplossing in ethanol 95 % v/v. Het reagens mag niet sterker gekleurd zijn dan strogeel.

Petroleumether; kookpunt 40-60 °C, broomgetal < 1, vrij van residuen.

Werkwijze

Weeg tot op 0,01 g nauwkeurig ongeveer 5 g vetmonster af in de kolf. Voeg 50 ml van de ethanolische KOH-oplossing toe. Breng de terugvloeikoeler aan.

Laat gedurende een uur zacht koken. Schakel de verwarming uit. Voeg via de koeler ongeveer 50 ml gedistilleerd water toe en schud.

Giet na afkoeling over in een scheitrechter en spoel de kolf enige malen met in totaal ongeveer 50 ml petroleumether.

Schud krachtig gedurende 1 minuut.

Laat vervolgens rusten tot volledige scheiding van de twee fasen is verkregen. Breng de zeepoplossing over in een tweede scheitrechter. Indien hierbij in uitzonderingsgevallen een emulsie optreedt, moet deze worden gebroken door toevoeging van kleine hoeveelheden ethanol of van een geconcentreerde oplossing van kaliumhydroxyde.

Extraheer de zeepoplossing nog 2 maal met telkens ongeveer 50 ml petroleumether.

Breng de 3 petroleumetheroplossingen over in een zelfde scheitrechter en was 3 maal met slechts ongeveer 50 ml 50 %ige ethanol.

Giet via de hals van de kolf — zo nodig in enige keren — de petroleumetheroplossing kwantitatief over in een maalkolf van 250 ml, waarbij de kolf met kleine hoeveelheden petroleumether wordt nagespoeld.

Verwijder onder voorzichtig verwarmen en onder vacuüm het oplosmiddel. Droog het residu onder vacuüm bij een temperatuur niet hoger dan 50 °C ten einde ongewenste oxydatie te voorkomen.

B. Scheiding van de sterolfractie met behulp van dunnelaagchromatografie

Breng in de ontwikkeltank een mengsel van n-heptaan/aceton — 85/15 (v/v°) of van bezeen/aceton 95/5 (v/v) tot een hoogte van ongeveer 1 cm ; dek met de dekplaat af en laat ten minste gedurende drie uren staan ter verkrijging van het gewenste vloeistof/damp evenwicht. Het verdient daarbij aanbeveling aan de binnenkant van de tank stroken filtreerpapier aan te brengen, die in de elutievloeistof hangen. Hierdoor wordt de looptijd van het front van het loopmiddel met ongeveer een derde verkort en verloopt de elutie van de componenten gelijkmatiger.

Bereid intussen een 5 %-oplossing van de met petroleumether geëxtraheerde onverzeepbare rest in chloroform. Breng ongeveer 0,3 ml van deze oplossing met behulp van de microspuit van 0,1 ml zodanig in een ononderbroken en gelijkmatige band op de plaat op ongeveer 1,5 cm van de onderrand op, dat een zo smal mogelijke startlijn wordt verkregen.

Breng volgens de gebruikelijke techniek aan één zijde van de plaat enkele µl van de vergelijkingsoplossing met cholesterol op ter bepaling van de Rf-waarde van de sterolen.

Plaats de plaat in de als hierboven aangegeven klaargemaakte ontwikkeltank. De temperatuur van de omgeving moet ongeveer 20 °C bedragen. Dek met de dekplaat af en ontwikkel tot het front van de loopvloeistof zich op ongeveer 1 cm van de bovenrand van de plaat bevindt. Neem de plaat uit de ontwikkeltank en laat het loopmiddel verdampen onder zachte verwarming in een stikstofstroom.

Maak de vlekken zichtbaar door de plaat vervolgens voorzichtig en gelijkmatig met de alcoholische oplossing van het natriumzout van 2'7'-dichloorfluoresceïne te besproeien. Bekijk de plaat in ultraviolet licht en bepaal de plaats van de sterolen als aangegeven door de cholesterolvlek afkomstig van de vergelijkingsoplossing. Krab de sterolband met een metalen spatel af. Breng de afgekrabde silicagel met behulp van 15 ml warme chloroform over in een bekerglas van 50 ml, roer, breng het silicagel volledig over in de filterkroes en filtreer.

Was vervolgens het filter driemaal met porties van telkens 15 ml warme chloroform en vang alle filtraten op in een kolf van 100 ml.

Damp de chloroformoplossing in tot 4 à 5 ml en breng over in het vooraf gewogen centrifugebuisje met ingeslepen stop. Droog door het oplosmiddel onder zacht verwarmen in een stikstofstroom af te dampen ; weeg de aldus verkregen sterolfractie.

C. Gaschromatografische bepaling van sterolen

1. *Bereiding van de trimethylsilyethers (TMS)*

Voor elke mg sterolen dient aan het centrifugebuisje 0,02 ml silaneringsreagens te worden toegevoegd, bestaande uit een mengsel van pyridinehexamethyldisilazaantrimethylchloorsilaan 9/3/1 (v/v/v), waarbij ieder spoortje vocht dient te worden vermeden. Plaats het buisje ongeveer een half uur in een exsiccator, sluit vervolgens af en centrifugeer gedurende enkele minuten. Gebruik vervolgens de verkregen oplossing voor de bepaling.

2. *Omstandigheden voor de gaschromatografische bepaling*

Temperatuur van de kolom : 220 tot 250 °C.

Temperatuur van het injectiesysteem indien afzonderlijk verwarmd : 20 tot 40 °C boven de temperatuur van de kolom. Stikstofstroom : 30 tot 60 ml/min. Ontkoppel de detector en conditioneer nieuwe kolommen onder de beschreven omstandigheden gedurende 16 tot 24 uren. Sluit de detector aan, steek de vlam aan, en regel de waterstofstroom en de lucht- of zuurstofstroom zodanig dat een geschikte vlamhoogte en gevoeligheid worden verkregen. Schakel de recorder in en laat het papier met passende snelheid aflopen ; stel het nulpunt en de verzwakker in. Als de basislijn stabiel is kan het apparaat worden gebruikt.

3. *Gevoeligheidstest*

Neem 5 ml van de oplossing voor de gevoeligheidstest, damp het oplosmiddel af en werk vervolgens als aangegeven onder 1 ; injecteer 0,1 tot 0,2 µl van de aldus bereide oplossing (TMS). In het chromatogram mag alleen een cholesterolpiek verschijnen.

Stel de verzwakker zodanig af dat ongeveer de hele schaal van de recorder wordt gebruikt.

4. *Bepaling van het scheidend vermogen*

Neem 5 ml van de oplossing voor de bepaling van het scheidend vermogen, damp het oplosmiddel af en werk vervolgens als aangegeven onder 1. Injecteer 0,1 tot 0,2 µl van de aldus bereide oplossing (TMS).

De cholesterol-, brassicasterol-, campesterol en β-sitosterolpieken moeten in het chromatogram verschijnen. Meet de retentieafstanden (afstand van het injecteerpunt tot het punt dat de maximale hoogte van de piek aangeeft) van de pieken : d_{CH} voor cholesterol, d_B voor brassicasterol, d_C voor campesterol en d_S voor β-sitosterol. Bepaal voorts de lengte van de basis van deze pieken (retentietijden tussen de snijpunten met de basislijn van de raaklijnen aan de buigpunten op de voorste en achterste zijde van de piek) ω_{CH} voor cholesterol, en ω_B voor brassicasterol.

Het scheidend vermogen, dat wordt gegeven door de volgende formule :

$$PR = 2\,\frac{(d_B - d_{CH})}{\omega_B + \omega_{CH}}$$

moet ten minste gelijk zijn aan 1.

Bereken de relatieve rententietijden (cholesterol = 1,00) voor brassicasterol, campesterol en β-sitosterol.

5. *Referentieproef*

Neem 5 ml van de oplossing voor de referentieproef, damp het oplosmiddel af en werk vervolgens als aangegeven onder 1. Injecteer 0,1 tot 0,2 µl van de aldus bereide oplossing (TMS). De pieken van campesterol, stigmasterol, β-sitosterol en Δ 7-stigmastenol moeten in het chromatogram verschijnen. Meet de retentieafstanden van de pieken : d_C voor campesterol, d_{ST} voor stigmasterol, d_S voor β-sitosterol en d_{ST-7} voor Δ 7-stigmastenol.

Bereken de relatieve retentietijden ; deze bedragen ongeveer :

Cholesterol	1,0
Brassicasterol	1,1
Campesterol	1,3
Stigmasterol	1,4
β-sitosterol	1,6 (1)
Δ 7-stigmastenol	1,8 (2)

6. *Analyse*

Injecteer 0,1 tot 0,2 µl van de TMS-oplossing van de te bepalen sterolen en neem het chromatogram.

D. **Weergave van de resultaten**

Voor een interpretatie van de samenstelling van de onderzochte sterolfractie mogen geen pieken met een andere rententietijd dan die welke experimenteel bepaald is voor de zes hierboven genoemde sterolen, in aanmerking worden genomen.

Het gehalte aan β-sitosterol in % wordt gegeven door de volgende formule :

$$\frac{\text{piekoppervlak voor β-sitosterol}}{\text{totaal oppervlak van de zes sterolpieken}} \times 100$$

Het gehalte aan β-sitosterol mag niet lager zijn dan 93 % betrokken op de totale sterolsamenstelling (in %).

---

(1) Indien andere sterolen zoals Δ 5-avenasterol onder deze voorwaarden dezelfde retentietijd als β-sitosterol hebben, worden zij als β-sitosterol aangerekend.

(2) Indien andere sterolen onder deze voorwaarden dezelfde retentietijd als Δ 7-stigmastenol hebben, worden zij als Δ 7-stigmastenol aangerekend.

BIJLAGE IX

BEPALING VAN HET OLIEGEHALTE VAN DE AFVALLEN VAN OLIJVEN

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.

Reagentia

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

WERKWIJZE

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 zodaing dat deeltjes worden verkregen die volledig door de zeef gaan. Meng zorgvuldig en analyseer onmiddellijk.

Monsterweging

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

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.

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.

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.

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 terugvloei 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.

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.

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.

WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Berekeningswijze en formule

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

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

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

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

waarin

S = gehalte aan olie in massaprocenten van het onbehandelde produkt (cfa)

U = vochtgehalte in %.

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.