

VERORDENING (EG) Nr. 702/2007 VAN DE COMMISSIE

van 21 juni 2007

tot wijziging van Verordening (EEG) nr. 2568/91 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 Gemeenschap,

Gelet op Verordening (EG) nr. 865/2004 van de Raad van 29 april 2004 houdende een gemeenschappelijke ordening der markten voor olijfolie en tafelolijven en tot wijziging van Verordening (EEG) nr. 827/68 ⁽¹⁾, en met name op artikel 5, lid 3,

Overwegende hetgeen volgt:

- (1) In Verordening (EEG) nr. 2568/91 ⁽²⁾ worden de fysieke en chemische kenmerken van olijfoliën en oliën uit afvallen van olijven en de methoden voor de evaluatie van deze kenmerken vastgelegd. Deze methoden en de grenswaarden voor de kenmerken van de oliën moeten, rekening houdend met het advies van chemische deskundigen en in samenhang met de werkzaamheden in het kader van de Internationale Olijfolieraad, worden bijgewerkt.
- (2) De chemische deskundigen zijn met name van mening dat de kwantificering van het percentage glycerol-2-monopalmitaat nauwkeuriger is om veresterde olie te detecteren. Ook door de verlaging van de grenswaarde voor stigmastadiënen in olijfolie van eerste persing kan een betere scheiding worden aangebracht tussen olijfolie van eerste persing en geraffineerde olijfolie.
- (3) Om de nodige tijd voor de aanpassing aan de nieuwe normen en voor de totstandbrenging van de voor de toepassing ervan benodigde middelen te geven en om de commerciële transacties niet te verstoren, dient deze verordening eerst op 1 januari 2008 van toepassing te worden. Om dezelfde redenen dient te worden bepaald dat olijfoliën en oliën uit afvallen van olijven die vóór die datum op wettige wijze in de Gemeenschap zijn

vervaardigd en geëtiketteerd of op wettige wijze in de Gemeenschap zijn ingevoerd en in het vrije verkeer zijn gebracht, mogen worden verkocht totdat de voorraden zijn uitgeput.

- (4) De in deze verordening vervatte maatregelen zijn in overeenstemming met het advies van het Comité van beheer voor olijfolie en tafelolijven,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

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

- 1) In artikel 2, lid 1, wordt het zesde streepje vervangen door:
„— voor de bepaling van het percentage glycerol-2-monopalmitaat, de in bijlage VII beschreven methode;”
- 2) De bijlagen worden overeenkomstig de bijlage bij deze verordening gewijzigd.

*Artikel 2*Deze verordening treedt in werking op de derde dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

Deze verordening is van toepassing met ingang van 1 januari 2008.

Producten die vóór 1 januari 2008 op wettige wijze in de Gemeenschap zijn vervaardigd en geëtiketteerd of op wettige wijze in de Gemeenschap zijn ingevoerd en in het vrije verkeer zijn gebracht, mogen echter worden verkocht totdat de voorraden zijn uitgeput.

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

Gedaan te Brussel, 21 juni 2007.

Voor de Commissie
Mariann FISCHER BOEL
Lid van de Commissie

⁽¹⁾ PB L 161 van 30.4.2004, blz. 97; gerectificeerd in PB L 206 van 9.6.2004, blz. 37.

⁽²⁾ PB L 248 van 5.9.1991, blz. 1. Verordening laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 1989/2003 (PB L 295 van 13.11.2003, blz. 57).

BIJLAGE

De bijlagen van Verordening (EEG) nr. 2568/91 worden als volgt gewijzigd:

1) De inhoudsopgave wordt als volgt gewijzigd:

a) de titel van bijlage II wordt vervangen door:

„Bepaling van vrije vetzuren, koude methode”;

b) de titel van bijlage VII wordt vervangen door:

„Bepaling van het percentage glycerol-2-monopalmitaat”.

2) Bijlage I wordt vervangen door:

„BIJLAGE I

KENMERKEN VAN OLIJFOLIE

Categorie	Zuurgraad (%) (*)	Peroxidegehalte mEq O ₂ /kg (*)	Was mg/kg (**)	Glycerol-2-monopalmitaat (%)	Stigmastadiënen mg/kg (1)	Verschil ECN42, HPLC en ECN42, theoretische berekening	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptische beoordeling voor de gebreken (Md) (*)	Organoleptische beoordeling Mediaan aan „fruitig“ (Mf) (*)
1. Extra olijfolie van eerste persing	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 als % palmitinezuur totaal ≤ 14 % ≤ 1,0 als % palmitinezuur totaal > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Olijfolie van eerste persing	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 als % palmitinezuur totaal ≤ 14 % ≤ 1,0 als % palmitinezuur totaal > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Olijfolie voor verlichting	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 als % palmitinezuur totaal ≤ 14 % ≤ 1,1 als % palmitinezuur totaal > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	Md > 2,5 (2)	—
4. Geraffineerde olijfolie	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 als % palmitinezuur totaal ≤ 14 % ≤ 1,1 als % palmitinezuur totaal > 14 %	—	≤ 0,3	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Olijfolie bestaande uit geraffineerde olijfoliën en olijfoliën van eerste persing	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 als % palmitinezuur totaal ≤ 14 % ≤ 1,0 als % palmitinezuur totaal > 14 %	—	≤ 0,3	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Ruwe oliën uit afvallen van olijven	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—
7. Geraffineerde oliën uit afvallen van olijven	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Olie uit afvallen van olijven	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

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

(2) Of als de mediaan voor de gebreken niet hoger is dan 2,5 en de mediaan „fruitig“ gelijk is aan 0.

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

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

Categorie	Verzuurgehalten ⁽¹⁾						Totaal trans- linoleen- zuuriso- meren (%)	Totaal transolie- zuuriso- meren (%)	Totaal trans- nolzuur en trans- linoleen- zuuriso- meren (%)	Sterolsamenstelling						Totaal sterolen (mg/kg)	Erythrodiol plus uvaol (%) ^(**)
	Myristin- ezuur (%)	Linoleen- zuur (%)	Arachide- zuur (%)	Eicosaan- zuur (%)	Beheer- zuur (%)	Lignocerin- zuur (%)				Choleste- rol (%)	Brassi- costerol (%)	Campes- terol (%)	Stigmaste- rol (%)	Betastosterol (%) ⁽¹⁾	Delta-7-stig- masterol (%)		
1. Extra olijfolie van eerste persing	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5			
2. Olijfolie van eerste persing	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5			
3. Olijfolie voor verlichting	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽¹⁾			
4. Geraffineerde olijfolie	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5			
5. Olijfolie bestaande uit geraffineerde olijfoliën en olijfoliën van eerste persing	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5			
6. Ruwe olie uit afvallen van olijven	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾			
7. Geraffineerde olie uit afvallen van olijven	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5			
8. Olie uit afvallen van olijven	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5			

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

(2) Totaal van: delta-5,23-stigmastadienol + clerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadienol.

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

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

Opmerkingen:

- De resultaten van de analyses moeten worden opgegeven met hetzelfde aantal decimale cijfers als in de normen voor elk kenmerk. De laatste significante decimaal wordt naar boven afgerond als de volgende decimaal hoger is dan 4.
- Om olie in een andere categorie in te delen of qua zuiverheid onvoldoende te verklaren, volstaat het dat een van de kenmerken niet aan de vastgestelde normen beantwoordt.
- Bij de kenmerken met een asterisk (*), die betrekking hebben op de kwaliteit van de olie, geldt:
 - voor olijfolie voor verlichting dat niet gelijktijdig aan alle betrokken normen hoeft te zijn voldaan;
 - voor olijfoliën van eerste persing dat het feit dat aan ten minste één van die normen niet is voldaan, leidt tot indeling in een andere van de categorieën olijfoliën van eerste persing.
- Bij de kenmerken met dubbele asterisk (**), geldt voor alle oliën uit afvallen van olijven dat niet gelijktijdig aan alle betrokken normen hoeft te zijn voldaan.

3) Aanhangsel 1 wordt als volgt gewijzigd:

a) het eerste streepje wordt vervangen door:

„— Zuurgraad: Bijlage II Bepaling van vrije vetzuren, koude methode”;

b) het dertiende streepje wordt vervangen door:

„— Verzadigde vetzuren op de 2-positie: Bijlage VII Bepaling van het percentage glycerol-2-monopalmitaat”.

4) De titel van bijlage II wordt vervangen door:

„BEPALING VAN VRIJE VETZUREN, KOUDE METHODE”.

5) Bijlage IV wordt vervangen door:

„BIJLAGE IV

BEPALING VAN HET WASGEHALTE MET BEHULP VAN CAPILLAIRE GASCHROMATOGRAPHIE

1. DOEL

Deze methode beschrijft een werkwijze voor de bepaling van het wasgehalte van olijfolie. De was wordt aan de hand van het aantal koolstofatomen gescheiden. De methode kan vooral worden gebruikt om geperste olijfolie te onderscheiden van geëxtraheerde olijfolie (uit persafvallen van olijven).

2. PRINCIPE

De olie of het vet, waaraan een geschikte interne standaard is toegevoegd, wordt gefractioneerd door kolomchromatografie over een gehydrateerde silicagel-kolom. De onder de werkomstandigheden eerst geëluëerde fractie (met een lagere polariteit dan de triglyceridenfractie) wordt opgevangen en vervolgens direct geanalyseerd met behulp van capillaire gaschromatografie.

3. APPARATUUR

3.1. Erlenmeyer, 25 ml.

3.2. Glazen kolom voor gaschromatografie met een inwendige diameter van 15,0 mm en een lengte van 30-40 cm, voorzien van een kraan.

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

3.3.1. Een oven met thermostaat voor de kolom met programmeerbare temperatuur.

3.3.2. Een „cold on column” injector om het monster direct op de kolom te brengen.

3.3.3. Een vlamionisatiedetector met een omzetter/versterker.

3.3.4. Een recorder/integrator, geschikt voor gebruik met de omzetter/versterker (3.3.3), met een responstijd van niet meer dan één seconde en met een variabele papersnelheid. (Er kan ook een computersysteem worden gebruikt waarmee de gaschromatografie-gegevens via een pc kunnen worden geregistreerd.)

3.3.5. Capillaire kolom, glas of kwartsglas, met een lengte van 8-12 m en een inwendige diameter van 0,25-0,32 mm en inwendig bekleed met een laagje stationaire fase met een uniforme dikte van 0,10-0,30 µm. (Gebruiksklare stationaire fase van type SE52 of SE54 is in de handel verkrijgbaar.)

3.4. Micro-injectiespuit, 10 µl, met een geharde naald, voor directe injectie op de kolom.

- 3.5. Elektrisch schudapparaat.
- 3.6. Rotatieverdamper.
- 3.7. Droogstoof.
- 3.8. Analytische balans met een nauwkeurigheid van + 0,1 mg.
- 3.9. Standaard-laboratoriumglaswerk.
4. REAGENTIA
- 4.1. Silicagel met een korrelgrootte tussen 60 en 200 µm.

Droog de silicagel in een droogstoof gedurende ten minste 4 uur bij 500 °C. Voeg na afkoelen een volume water toe dat overeenkomt met 2 % van het gewicht van de gebruikte silicagel. Schud voldoende om de massa uniform te verdelen. Laat ten minste 12 uur vóór gebruik in het donker rusten.

- 4.2. n-Hexaan (voor chromatografie).
- 4.3. Ethylether (voor chromatografie).
- 4.4. n-Heptaan (voor chromatografie).
- 4.5. Standaardoplossing van laurylarachidaat, 0,1 % (m/v) in hexaan (interne standaard). (Ook *palmitylpalmitaat en myristylstearaat kunnen worden gebruikt.*)
- 4.5.1. *Soedanrood 1 (1-fenylazo-2-naftol).*
- 4.6. Draaggas: zuivere waterstof of helium (voor gaschromatografie).
- 4.7. Hulpgasen:
 - zuivere waterstof (voor gaschromatografie);
 - zuivere lucht (voor gaschromatografie).

5. PROCEDURE

5.1. Voorbehandeling van de chromatografiekolom

Suspendeer 15 g silicagel (4.1) in n-hexaan (4.2) en breng dit in de kolom (3.2). Laat eerst spontaan uitzakken en vervolgens met een elektrisch schudapparaat (3.5) om de chromatografielaag homogener te maken. Laat 30 ml n-hexaan doorlopen om eventuele verontreinigingen te verwijderen. Weeg met de balans (3.8) nauwkeurig 500 mg monster af in de erlenmeyer van 25 ml (3.1) en voeg afhankelijk van het verwachte wasgehalte de juiste hoeveelheid interne standaard (4.5) toe. Voeg bij olijfolie bijvoorbeeld 0,1 mg laurylarachidaat toe en bij olie uit afvallen van olijven 0,25-0,5 mg. Breng het zo voorbehandelde monster met behulp van twee porties van elk 2 ml n-hexaan (4.2) op de chromatografiekolom.

Laat het oplosmiddel door de kolom lopen tot 1 mm boven de bovenkant van het adsorbens en laat vervolgens nog eens 70 ml n-hexaan doorlopen om van nature aanwezige n-alkanen te verwijderen. Begin vervolgens de chromatografische elutie met 180 ml van het mengsel n-hexaan/ethylether (99:1) met een elutiesnelheid van ongeveer 15 druppels per 10 seconden. De elutie van het monster moet bij kamertemperatuur (22 ± 4 °C) worden uitgevoerd.

NB:

- Het mengsel n-hexaan/ethylether (99:1) moet elke dag vers worden bereid.
- Voor een visuele controle op een juiste elutie van de was kan aan het opgeloste monster 100 µl soedanrood 1 (1 % in de elutievloeistof) worden toegevoegd. Aangezien deze kleurstof een retentietijd tussen die van de was en de triglyceriden heeft, kan de elutie worden gestopt wanneer de kleur de onderkant van de chromatografiekolom bereikt, omdat de was dan volledig is geëluëerd.

Damp de aldus verkregen fractie in de rotatieverdamer (3.6) in tot bijna droog. Verwijder de laatste 2 ml oplosmiddel met een zachte stikstofstroom en neem het residu op in 2-4 ml n-heptaan.

5.2. Gaschromatografische analyse

5.2.1. Voorbereidende werkzaamheden

Bevestig de kolom in de gaschromatograaf (3.3), waarbij het inlaatstuk wordt aangesloten op het „on-column“-systeem en het uiteinde op de detector. Voer de gebruikelijke controle van de gaschromatografieapparatuur uit (toestand van de gasleidingen, efficiëntie van de detector en de recorder enz.).

Als de kolom voor de eerste keer wordt gebruikt, wordt conditionering aanbevolen. Laat een zachte gasstroom door de kolom lopen en schakel de gaschromatografieapparatuur in. Verwarm geleidelijk totdat na ongeveer 4 uur een temperatuur van 350 °C wordt bereikt. Houd deze temperatuur gedurende ten minste 2 uur aan en stel vervolgens de apparatuur in op de gebruiksomstandigheden (gassnelheid instellen, vlam ontsteken, elektronische recorder (3.3.4) aansluiten, temperatuur van de kolomoven instellen, temperatuur van de detector instellen enz.) en registreer het signaal bij een gevoeligheid die ten minste twee keer zo groot is als bij de uitvoering van de analyse wordt verwacht. De basislijn moet lineair zijn, mag geen enkele piek vertonen en mag niet verlopen.

Een rechtlijnig negatief verloop wijst op lekkage bij de aansluiting van de kolom; een positief verloop wijst op een onvoldoende conditionering van de kolom.

5.2.2. Keuze van de werkomstandigheden

In het algemeen dienen de volgende werkomstandigheden te worden aangehouden:

— kolomtemperatuur:

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

— detectortemperatuur: 350 °C;

— geïnjecteerde hoeveelheid: 1 µl van de oplossing (2-4 ml) in n-heptaan;

— draaggas: helium of waterstof met de optimale lineaire snelheid voor het gekozen gas (zie aanhangsel);

— gevoeligheid van de recorder: deze moet voldoen aan de volgende voorwaarden:

Deze voorwaarden kunnen afhankelijk van de kenmerken van de kolom en de gaschromatograaf zodanig worden gewijzigd dat alle wassen volledig worden gescheiden met een afdoende resolutie van de pieken (zie figuur), terwijl de retentietijd van de interne standaard (C₃₂) 18 ± 3 minuten moet bedragen. De meest representatieve piek van de wassen moet een hoogte van ten minste 60 % van de volle schaaluitslag hebben.

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

NB: Gezien de hoge eindtemperatuur wordt een positief verloop toegestaan, dat niet groter mag zijn dan 10 % van de volle schaaluitslag.

5.3. Uitvoering van de analyse

Zuig met de 10 µl micro-injectiespuit 1 µl oplossing op. Trek de plunjer van de spuit zover uit dat de naald leeg is. Steek de naald door het membraan van de injectie-eenheid en injecteer snel na 1-2 seconden; trek de naald ongeveer 5 seconden later langzaam terug.

Neem het chromatogram op tot de was volledig is geëluëerd.

De basislijn moet steeds aan de vereiste voorwaarden voldoen.

5.4. Identificatie van de pieken

De verschillende pieken worden geïdentificeerd aan de hand van de retentietijd en door vergelijking met wasmengsels met een bekende retentietijd die onder dezelfde omstandigheden zijn geanalyseerd.

De figuur bevat een chromatogram van de wassen in een olijfolie van eerste persing.

5.5. Kwantitatieve evaluatie

Bereken met de integrator het piekoppervlak van de interne standaard en de alifatische esters (C_{40} - C_{46}).

Bereken met de volgende formule het wasgehalte van elke ester in mg/kg vet:

$$\text{ester mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1\,000}{A_s \times m}$$

Hierbij is:

A_x = het piekoppervlak van elke ester in mm^2 ;

A_s = het piekoppervlak van de interne standaard in mm^2 ;

m_s = de toegevoegde massa interne standaard in mg;

m = de massa van het monster voor de bepaling in g.

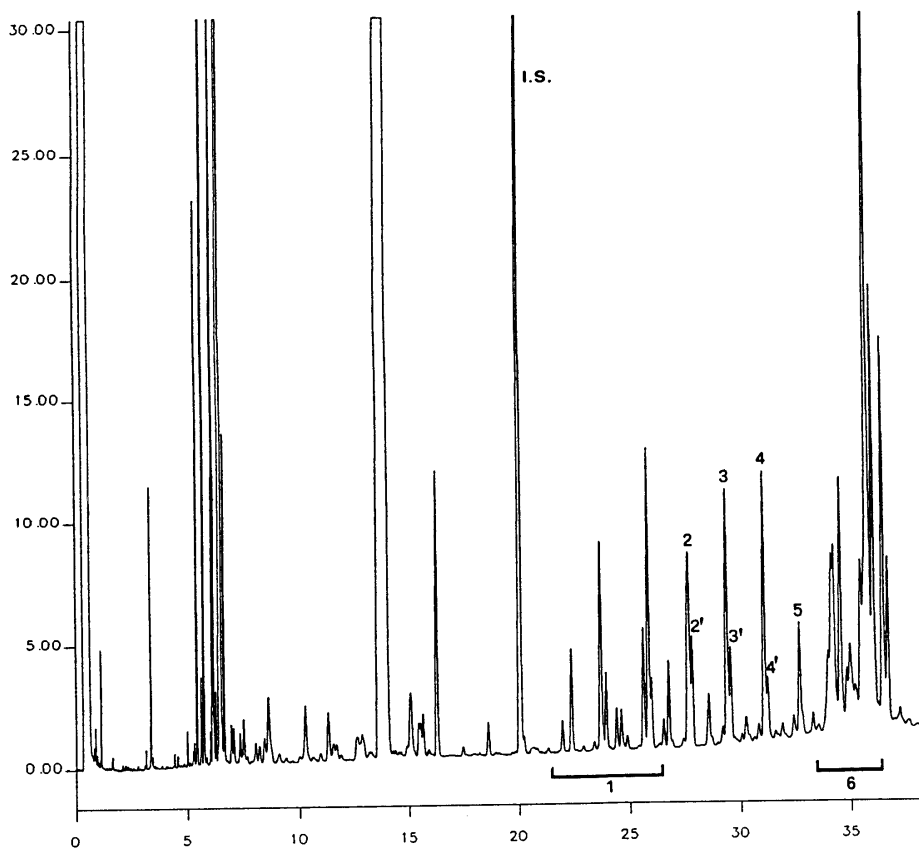
6. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Vermeld de som van de gehalten aan de verschillende wassen (C_{40} - C_{46}) in mg/kg vet (ppm).

NB: De te kwantificeren verbindingen verwijzen naar de pieken met een even aantal koolstofatomen tussen de esters C_{40} en C_{46} , zoals weergegeven in onderstaand chromatogram voor was uit olijfolie. Als de ester C_{46} een dubbele piek oplevert, wordt aanbevolen voor de identificatie daarvan de wasfractie van een olijfolie uit afvallen van olijven te analyseren, aangezien de C_{46} -fractie daarin duidelijk de overhand heeft en de piek dus gemakkelijk te identificeren is.

De resultaten worden met één cijfer achter de komma vermeld.

Figuur
Gaschromatogram van de wasfractie van een olijfolie (*)



Verklaring:

- I.S. = Laurylarachidaat
- 1 = Diterpeenesters
- 2 + 2' = C₄₀-esters
- 3 + 3' = C₄₂-esters
- 4 + 4' = C₄₄-esters
- 5 = C₄₆-esters
- 6 = Sterolesters en triterpeenalcoholen.

(*) Na de elutie van de sterolesters mag het chromatogram geen significante pieken (triglyceriden) meer bevatten.

Aanhangsel

Bepaling van de lineaire gassnelheid

Injecteer 1-3 µl methaan (of propaan) in de gaschromatograaf nadat deze op de normale werkomstandigheden is ingesteld. Registreer hoeveel tijd verstrijkt tussen het moment waarop het gas op de kolom wordt geïnjecteerd en het moment waarop de piek verschijnt (tM).

De lineaire snelheid (in cm/s) wordt berekend met de formule L/t_M , waarbij L de lengte van de kolom in cm is en tM de geregistreerde tijd in seconden.”.

6) Bijlage VII wordt vervangen door:

„BIJLAGE VII

BEPALING VAN HET PERCENTAGE GLYCEROL-2-MONOPALMITAAT

1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

Hier wordt de analysemethode beschreven voor de bepaling van het percentage palmitinezuur op de 2-positie van triglyceriden via de bepaling van glycerol-2-monopalmitaat

Deze methode kan worden gebruikt voor plantaardige oliën die bij kamertemperatuur (20 °C) vloeibaar zijn.

2. PRINCIPE

Na een voorbehandeling wordt het oliemonster behandeld met pancreaslipase: door een partiële en specifieke hydrolyse op de 1- en 3-positie van het triglyceride ontstaan 2-monoglyceriden. Het percentage glycerol-2-monopalmitaat in de monoglyceridefractie wordt na silylering bepaald met behulp van capillaire gaschromatografie.

3. APPARATUUR EN STANDAARDMATERIAAL

- 3.1. Erlenmeyer, 25 ml.
- 3.2. Bekerglazen, 100, 250 en 300 ml.
- 3.3. Glazen chromatografiekolom met een inwendige diameter van 21-23 mm en een lengte van 400 mm, voorzien van een filter van gesinterd glas en een kraan.
- 3.4. Maatcilinders, 10, 50, 100 en 200 ml.
- 3.5. Kolven, 100 en 250 ml
- 3.6. Rotatieverdamer.
- 3.7. Centrifugebuizen met een ronde bodem, 10 ml, met geslepen stop.
- 3.8. Centrifuge voor buizen van 10 en 100 ml.
- 3.9. Waterbad waarin de temperatuur op 40 °C + 0,5 °C kan worden gehouden.
- 3.10. Meetpipetten, 1 en 2 ml.
- 3.11. Injectiespuit, 1 ml.
- 3.12. Micro-injectiespuit, 100 µl.
- 3.13. Scheitrechter, 1 000 ml.
- 3.14. Gaschromatograaf voor een capillaire kolom met een „cold on column” injector om het monster direct op de kolom te brengen en een oven waarin de ingestelde temperatuur op ± 1 °C nauwkeurig kan worden gehouden.
- 3.15. „Cold on column” injector om het monster direct op de kolom te brengen.
- 3.16. Vlamionisatiedetector en elektrometer.
- 3.17. Recorder/integrator, geschikt voor de elektrometer, met een responstijd van niet meer dan één seconde en met een variabele papersnelheid.
- 3.18. Capillaire kolom, glas of kwartsglas, met een lengte van 8-12 m en een inwendige diameter van 0,25-0,32 mm en bekleed met een laagje 5 % methylpolysiloxaan of fenylmethylpolysiloxaan met een dikte van 0,10-0,30 µm, die bij 370 °C kan worden gebruikt.
- 3.19. Micro-injectiespuit, 10 µl, met een geharde naald, met een lengte van ten minste 7,5 cm, voor directe injectie op de kolom.

4. REAGENTIA
- 4.1. Silicagel met een korrelgrootte tussen 0,063 en 0,200 mm (70/280 mesh), als volgt voorbehandeld: droog de silicagel in een porseleinen kroes in een droogstoof gedurende 4 uur bij 160 °C en laat vervolgens in een exsiccator afkoelen. Voeg als volgt een volume water toe dat overeenkomt met 5 % van het gewicht van de silicagel: weeg in een erlenmeyer van 500 ml 152 g silicagel af en voeg 8 g gedestilleerd water toe; sluit de erlenmeyer af en schud voorzichtig om het water uniform te verdelen. Laat ten minste 12 uur vóór gebruik rusten.
- 4.2. n-Hexaan (voor chromatografie).
- 4.3. Isopropanol.
- 4.4. Isopropanol, 1/1 (v/v) oplossing in water.
- 4.5. Pancreaslipase. De gebruikte lipase moet een activiteit tussen 2,0 en 10 lipase-eenheden per mg hebben (In de handel is pancreaslipase met een activiteit tussen 2 en 10 enzymeenheden per mg verkrijgbaar.)
- 4.6. Tris(hydroxymethyl)aminomethaan-bufferoplossing: 1 M oplossing in water, met geconcentreerd HCl (1/1 v/v) op pH 8 gebracht (controle met potentiometer).
- 4.7. Natriumcholaat, enzymkwaliteit, 0,1 %-oplossing in water (deze oplossing moet binnen 15 dagen na de bereiding worden gebruikt).
- 4.8. Calciumchloride, 22 %-oplossing in water.
- 4.9. Diethylether (voor chromatografie).
- 4.10. Elutievloeistof: mengsel van n-hexaan en diethylether (87/13 v/v).
- 4.11. Natriumhydroxide, 12 %-oplossing (g/g).
- 4.12. Fenolftaleïne, 1 %-oplossing in ethanol.
- 4.13. Draaggas: waterstof of helium (voor gaschromatografie).
- 4.14. Hulpgas: waterstof (minimaal 99 %, watervrij en zonder organische stoffen) en lucht (voor gaschromatografie en met dezelfde zuiverheid).
- 4.15. Silaniseringsreagens: mengsel pyridine/hexamethyldisilazaan/trimethylchloorsilaan (9/3/1 v/v/v) (In de handel zijn gebruiksklare oplossingen verkrijgbaar.) Er kunnen ook andere silyleringsreagentia worden gebruikt, bijvoorbeeld bis(trimethylsilyl)trifluoracetamide + 1 % trimethylchloorsilaan, verdund met een gelijk volume waterrijke pyridine.
- 4.16. Referentiemonsters: zuivere monoglyceriden of mengsels van monoglyceriden met een bekende samenstelling die vergelijkbaar is met die van het monster.
5. PROCEDURE
- 5.1. **Voorbehandeling van het monster**
- 5.1.1. Olie met een gehalte aan vrij zuur van minder dan 3 % hoeft niet vóór de silicagel-kolomchromatografie te worden geneutraliseerd. Olie met een gehalte aan vrij zuur van meer dan 3 % moet overeenkomstig punt 5.1.1.1 worden geneutraliseerd.
- 5.1.1.1. Breng in een scheitrechter van 1 000 ml (3.13) 50 g olie en 200 ml n-hexaan. Voeg 100 ml isopropanol toe en een hoeveelheid 12 %-natriumhydroxideoplossing (4.11) die overeenkomt met het gehalte aan vrij zuur van de olie plus 5 %. Schud krachtig gedurende één minuut. Voeg 100 ml gedestilleerd water toe, schud opnieuw en laat bezinken.
- Laat na scheiding van de lagen de onderste laag met de zepen weglopen. Verwijder tevens mogelijke tussenlagen (slijmachtige en onopgeloste stoffen). Was de oplossing van de geneutraliseerde olie in hexaan met opeenvolgende porties van 50-60 ml van de oplossing van isopropanol in water (1/1 v/v) (4.4) tot de roze kleur van fenolftaleïne verdwijnt.
- Verwijder het merendeel van het hexaan door vacuümdestillatie (bijvoorbeeld met een rotatieverdamer) en breng de olie over in een kolf van 100 ml (3.5). Droog de olie onder vacuüm tot het oplosmiddel volledig is verwijderd.
- Na deze bewerking moet de zuurgraad van de olie lager dan 0,5 % zijn.

- 5.1.2. Breng 1,0 g olie, voorbehandeld zoals hierboven beschreven, in een erlenmeyer van 25 ml (3.1) en los dit op in 10 ml elutievlloeistof (4.10). Laat de oplossing vóór de silicagel-kolomchromatografie gedurende ten minste 15 minuten rusten.

Centrifugeer de oplossing, als deze troebel is, om optimale omstandigheden voor de chromatografie te waarborgen. (Er kunnen gebruiksklare SPE-silicagelpatronen van 500 mg worden gebruikt).

- 5.1.3. *Voorbehandeling van de chromatografiekolom*

Giet ongeveer 30 ml elutievlloeistof (4.10) in de kolom (3.3) en breng met een glasstaaf onder in de kolom een propje watten; duw het aan om de lucht te verwijderen.

Bereid in een bekersglas een suspensie van 25 g silicagel (4.1) in ongeveer 80 ml elutievlloeistof en giet dit met behulp van een trechter in de kolom.

Controleer of alle silicagel in de kolom is gegoten; spoel met elutievlloeistof (4.10), open de kraan en laat het vlloeistofniveau zakken tot ongeveer 2 mm boven de bovenkant van de silicagel-laag.

- 5.1.4. *Kolomchromatografie*

Weeg in een erlenmeyer van 25 ml (3.1) precies 1,0 g monster af, voorbehandeld volgens punt 5.1.

Los het monster op in 10 ml elutievlloeistof (4.10). Schenk de oplossing op de chromatografiekolom, voorbehandeld volgens punt 5.1.3. Zorg dat het oppervlak van de kolom niet verstoord wordt.

Open de kraan en laat de monsteroplossing inzakken tot de bovenkant van de silicagel-laag. Elueer met 150 ml elutievlloeistof. Stel de snelheid in op 2 ml/minuut (zodat de 150 ml in ongeveer 60-70 minuten door de kolom loopt).

Vang het eluaat op in een vooraf getarreedde kolf van 250 ml. Verdamp het oplosmiddel onder vacuüm en verwijder de laatste sporen ervan onder een stikstofstroom.

Weeg de kolf en bereken de opgevangen hoeveelheid extract.

(Bij gebruik van gebruiksklare SPE-silicagelpatronen is de werkwijze: Breng 1 ml oplossing (5.1.2) in de vooraf voorbereide patronen met 3 ml n-hexaan.

Elueer na het doorlopen van de oplossing met 4 ml n-hexaan/diethylether (9/1 v/v).

Vang het eluaat op in een buis van 10 ml en damp droog onder een stikstofstroom.

Laat pancreaslipase (5.2) op het residu inwerken. Het is van cruciaal belang dat de vetzuursamenstelling vóór en na de passage door de SPE-patroon wordt bepaald).

5.2. **Hydrolyse met pancreaslipase**

- 5.2.1. Weeg in de centrifugebuis overeenkomstig punt 5.1 0,1 g van de voorbehandelde olie af. Voeg 2 ml bufferoplossing (4.6), 0,5 ml natriumcholaatoplossing (4.7) en 0,2 ml calciumchlorideoplossing toe en schud na elke toevoeging goed. Sluit de buis met de geslepen stop en zet hem in het waterbad bij $40 \pm 0,5$ °C.

- 5.2.2. Voeg 20 mg lipase toe, schud voorzichtig (zorg dat de stop niet nat wordt) en zet de buis gedurende precies 2 minuten in het waterbad, haal de buis eruit, schud krachtig gedurende precies één minuut en laat de buis afkoelen.

- 5.2.3. Voeg 1 ml diethylether toe, zet de stop op de buis en schud krachtig, centrifugeer en breng de etheroplossing met een micro-injectiespuit over in een schone droge buis.

5.3. **Bereiding van de gesilaniseerde verbindingen en voorbereiding van de gaschromatografie**

- 5.3.1. Breng met een micro-injectiespuit 100 µl oplossing (5.2.3) in een rondbodemkolf van 10 ml.

- 5.3.2. Verwijder het oplosmiddel onder een zachte stikstofstroom, voeg 200 µl silaniseringsreagens (4.15) toe, zet de stop op de kolf en laat gedurende 20 minuten staan.

- 5.3.3. Voeg na 20 minuten 1-5 ml (afhankelijk van de chromatografie-omstandigheden) n-hexaan toe: de resulterende oplossing is gereed voor gaschromatografie.

5.4. Gaschromatografie

De werkomstandigheden zijn als volgt:

- temperatuur van de injector („on column” injector) onder het kookpunt van het oplosmiddel (68 °C);
- temperatuur van de detector: 350 °C;
- temperatuur van de kolom: de oventemperatuur wordt als volgt geprogrammeerd: eerst gedurende 1 minuut op 60 °C, daarna met 15 °C per minuut oplopend tot 180 °C, vervolgens met 5 °C per minuut oplopend tot 340 °C en ten slotte gedurende 13 minuten op 340 °C;
- Draaggas: waterstof of helium met een lineaire snelheid die voldoende is om de in figuur 1 aangegeven resolutie te verkrijgen. De retentietijd van triglyceride C₅₄ moet 40 + 5 minuten zijn (zie figuur 2). (Bovenstaande werkomstandigheden worden ter indicatie aangegeven. Ze moeten in elke situatie worden geoptimaliseerd om de gewenste resolutie te verkrijgen. De piekhoogte van glycerol-2-monopalmitaat moet minimaal 10 % van de volle schaaluitslag van de recorder zijn.)
- Geïnjecteerde hoeveelheid: 0,5-1 µl van de oplossing (5 ml) in n-hexaan (5.3.3).

5.4.1. Identificatie van de pieken

De verschillende monoglyceriden worden geïdentificeerd aan de hand van de verkregen retentietijd en door vergelijking met de pieken voor standaardmengsels monoglyceriden die onder dezelfde omstandigheden zijn geanalyseerd.

5.4.2. Kwantitatieve bepaling

Met een elektronische integrator wordt het oppervlak van elke piek berekend.

6. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

Het percentage glycerol-2-monopalmitaat wordt aan de hand van de verhouding tussen het piekoppervlak voor deze stof en het piekoppervlak voor alle monoglyceriden samen (zie figuur 2) berekend met de formule:

$$\text{Glycerolmonopalmitaat (\%)} = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

Hierbij is:

A_x = het piekoppervlak voor glycerol-2-monopalmitaat en

ΣA = de som van de piekoppervlakken van alle monoglyceriden samen.

Het resultaat moet met één cijfer achter de komma worden vermeld.

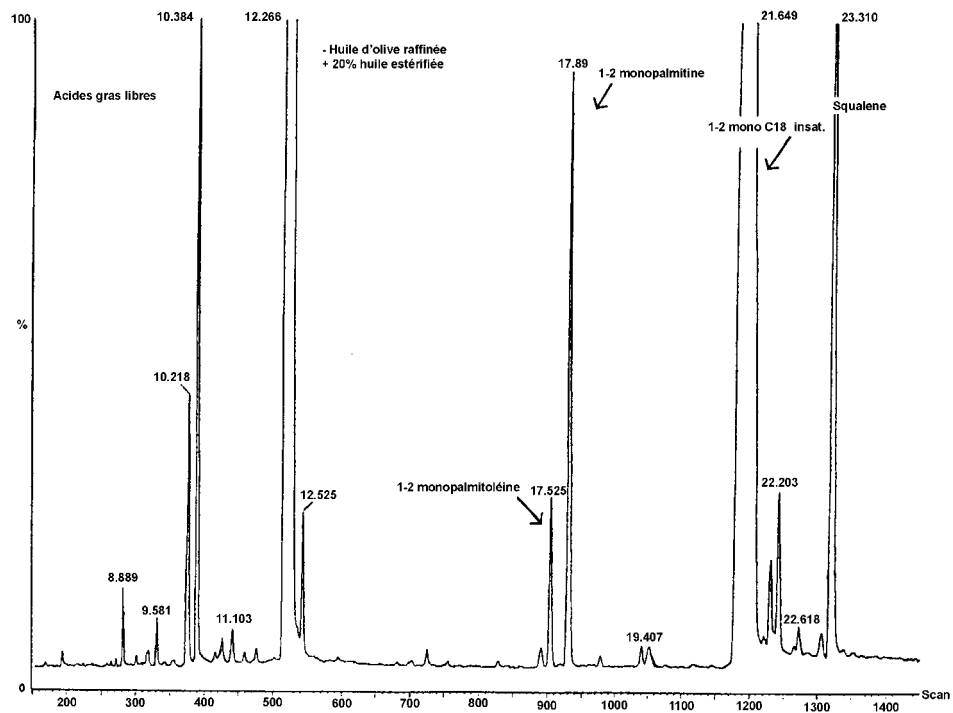
7. ANALYSEVERSLAG

Het analyseverslag moet bevatten:

- een verwijzing naar deze methode;
- alle informatie die nodig is om het monster volledig te kunnen identificeren;
- het resultaat van de analyse;
- elke afwijking van deze methode, ongeacht of dit op grond van een besluit van de betrokken partijen of om een andere reden is gebeurd;
- de identificatiegegevens van het laboratorium, de datum van de analyse en de handtekeningen van de voor de analyse verantwoordelijke personen.

Figuur 1

Chromatogram van de producten van de silaniseringsreactie, verkregen door de inwerking van lipase op een geraffineerde olijfolie waaraan 20 % veresterde olie is toegevoegd (100 %).



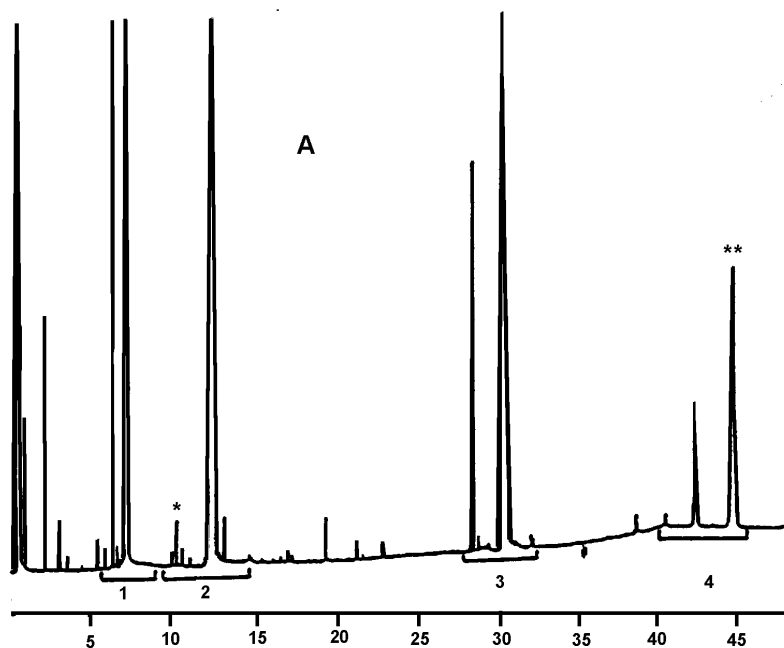
NdT: Acides gras libres = Vrije vetzuren; Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée = Geraffineerde olijfolie + 20 % veresterde olie; 1-2 monopalmitoléine = 1-2-monopalmitoléine; 1-2 monopalmitine = 1-2 monopalmitine; 1-2 mono C₁₈ insat. = 1-2 mono C₁₈ onverz.; Squalene = Squalen

Figuur 2

Chromatogram van:

A) onveresterde olijfolie na lipase en na silanisering; onder deze omstandigheden (capillaire kolom van 8-12 m) wordt de wasfractie tegelijk met de diglyceridefractie of vlak daarna geëluëerd.

Na lipase mag het gehalte aan triglyceriden niet hoger zijn dan 15 %.



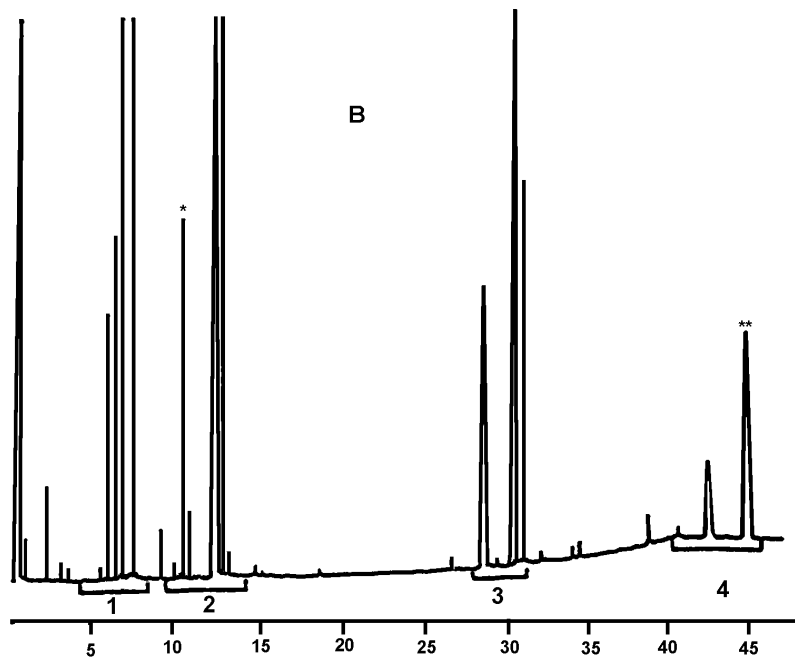
Verklaring:

- 1 = Vrije vetzuren
- 2 = Monoglyceriden
- 3 = Diglyceriden
- 4 = Triglyceriden
- * = 2-monopalmitine
- ** = Triglyceride C₅₄

Chromatogram van:

B) veresterde olie na lipase en na silanisering; onder deze omstandigheden (capillaire kolom van 8-12 m) wordt de wasfractie tegelijk met de diglyceridefractie of vlak daarna geëluëerd.

Na lipase mag het gehalte aan triglyceriden niet hoger zijn dan 15 %.

*Verklaring:*

- 1 = Vrije vetzuren
- 2 = Monoglyceriden
- 3 = Diglyceriden
- 4 = Triglyceriden
- * = 2-monopalmitine
- ** = Triglyceride C₅₄

8. OPMERKINGEN

Opmerking 1: BEREIDING VAN LIPASE

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

Koel 5 kg verse varkenspancreas af tot 0 °C. Verwijder het omringende vet en bindweefsel en maal het restant in een messenmolen fijn tot een vloeibare pasta is overgebleven. Roer deze pasta gedurende 4-6 uur met 2,5 l waterrijke aceton en centrifugeer daarna. Extraheer het residu nog driemaal met hetzelfde volume waterrijke aceton en vervolgens tweemaal met een 1/1 (v/v) mengsel van aceton en diethylether en tweemaal met diethylether.

Droog het residu gedurende 48 uur onder vacuüm; hierdoor wordt een stabiel poeder verkregen dat lange tijd vochtvrij in een koelkast kan worden bewaard.

Opmerking 2: CONTROLE VAN DE LIPASEACTIVITEIT

Bereid als volgt een olijfolie-emulsie:

Schud in een mengapparaat gedurende 10 minuten een mengsel van 165 ml van een oplossing van arabische gom (100 g/l), 15 g ijsgruis en 20 ml vooraf geneutraliseerde olijfolie.

Breng in een bekeerglas van 50 ml achtereenvolgens 10 ml van deze emulsie, 0,3 ml natriumcholaatoplossing (0,2 g/ml) en 20 ml gedestilleerd water.

Zet het bekeerglas in een waterbad dat op 37 °C is ingesteld; hang de elektroden van de pH-meter in de vloeistof en voeg een roermagneetje toe.

Voeg met een buret druppelsgewijs een 0,1 N natriumhydroxideoplossing toe tot een pH van 8,3 is bereikt.

Voeg een hoeveelheid suspensie van lipasepoeder in water toe (0,1 g lipase/ml). Start de stopwatch zodra de pH-meter een pH van 8,3 aangeeft en voeg druppelsgewijs de natriumhydroxideoplossing met een zodanige snelheid toe dat de pH 8,3 blijft. Noteer elke minuut het verbruikte volume.

Geef in grafiekvorm de verkregen gegevens weer, waarbij op de x-as de tijd wordt aangegeven en op de y-as het volume (ml) 0,1 N alkalioplossing dat is verbruikt om de pH constant te houden. Het resultaat dient een rechte lijn te zijn.

De lipaseactiviteit, uitgedrukt in lipase-eenheden per mg, wordt met de volgende formule berekend:

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

Hierbij is:

A = de activiteit in lipase-eenheden/mg;

V = het volume (ml) 0,1 N natriumhydroxideoplossing per minuut (berekend uit de grafiek);

N = de normaliteit van de natriumhydroxideoplossing;

m = de massa van het onderzochte lipase (in mg).

Eén lipase-eenheid wordt gedefinieerd als de hoeveelheid enzym die per minuut 10 micro-equivalent zuur vrijmaakt.”.

7) In bijlage X.A wordt punt 6.2 vervangen door:

„6.2. De methylesters worden bereid volgens werkwijze B van bijlage X.B. De vetstoffen met een gehalte aan vrij zuur van meer dan 3 % moeten eerst worden geneutraliseerd overeenkomstig punt 5.1.1 van bijlage VII.”.