

BULLETIN

BENELUX

PUBLIKATIEBLAD

INHOUD :

Beschikking van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie betreffende de toepassing van Benelux-referentiemethoden van onderzoek inzake eetbare oliën, M (80) 5, ondertekend te Brussel op 17 oktober 1980.

MET REGLEMENT

TABLE DES MATIERES :

Décision du Comité de Ministres de l'Union économique Benelux concernant l'application de méthodes d'analyse de référence Benelux relatives aux huiles comestibles, M (80) 5, signée à Bruxelles, le 17 octobre 1980.

AVEC REGLEMENT

Het Benelux-Publikatieblad wordt uitgegeven door het Secretariaat-Generaal van de BENELUX ECONOMISCHE UNIE, Regentschapsstraat 39, 1000 Brussel.

Het **Publikatieblad** bevat de tekst van de in Benelux-verband gesloten overeenkomsten tussen de drie Staten, alsmede van door het Comité van Ministers der Unie genomen beschikkingen en aanbevelingen.

Het **Publikatieblad** kan tevens worden gebruikt als periodieke aanvulling van de « **Benelux-Basisteksten** ».

Deze bevatten de systematisch ingedeelde, volledige verzameling van de officiële teksten der Unie.

Om de **Basisteksten** bij te werken, dient men de omslag van het **Publikatieblad** te verwijderen en de losse, geperforeerde blaadjes in de daartoe bestemde banden der **Basisteksten** in te lassen volgens de bij ieder nummer gevoegde aanwijzingen.

Voor prijs en verkoopadressen van het **Publikatieblad** en de **Basisteksten** raadplege men de achterzijde van deze kaft.

Le Bulletin Benelux est édité par le Secrétariat général de l'UNION ECONOMIQUE BENELUX, 39, rue de la Régence, 1000 Bruxelles.

Dans le **Bulletin Benelux** sont repris les textes des conventions conclues dans le cadre du Benelux entre les trois Etats, ainsi que les textes de décisions et recommandations prises par le Comité de Ministres de l'Union.

Le Bulletin Benelux peut également servir pour compléter régulièrement les « **Textes de base Benelux** ».

Ceux-ci contiennent la collection complète des textes officiels, classés systématiquement.

Pour la mise à jour des **Textes de base**, il suffit de détacher la couverture du Bulletin et d'insérer les feuillets mobiles perforés dans les reliures des **Textes de base**, en suivant les instructions accompagnant chaque numéro.

Pour les prix et adresses des Bureaux de vente du Bulletin et des **Textes de base**, prière de consulter la dernière page de cette couverture.

BENELUX-PUBLIKATIE-

BLAD 1980-5
december 1980

Dit nummer bevat uitsluitend Beschikking M (80) 5 van 17 oktober 1980, met het daarbij behorende Reglement, dit laatste in foto-copievorm.

In het voorgaande nummer, 1980-4, is alleen de Beschikking zelf opgenomen, doch niet het Reglement, gezien de grote omvang daarvan en de beperkte kring van belanghebbenden (zie blz. 2398-2399, Basisteksten Deel 6/II). Aldus wordt voor de abonnees een kostenbesparing bereikt en een overmatige aanvulling der Basisteksten vermeden.

Een exemplaar van nr. 1980-5 wordt gratis toegezonden aan de abonnees die het Secretariaat-Generaal van Benelux daarom verzoeken. Abonnees die meer exemplaren wensen en niet-abonnees kunnen het nummer bestellen bij de gebruikelijke verkooppunten van het Publikatieblad tegen betaling van F 40,— of f 2,75 per exemplaar.

De blaadjes van dit nummer dienen derhalve niet te worden ingelast in de Benelux-Basisteksten.

BULLETIN BENELUX

1980-5
décembre 1980

Le présent numéro contient uniquement la Décision M (80) 5 du 17 octobre 1980, ainsi que le Règlement y afférent, ce dernier sous forme de photocopie.

Le numéro précédent, 1980-4, n'a repris que le texte de la Décision même, et non celui du Règlement, ce dernier étant d'une longueur inhabituelle et n'intéressant qu'un nombre limité de personnes (voir les pp. 2398-2399, Textes de Base, Tome 6/II). Les abonnés peuvent ainsi réaliser une économie de frais, et on évite en même temps de devoir ajouter un supplément excessif aux Textes de Base.

Un exemplaire du n^o 1980-5 sera envoyé gratuitement aux abonnés qui en feront la demande au Secrétariat général du Benelux. Ceux qui désirent obtenir des exemplaires supplémentaires ainsi que les non-abonnés peuvent commander ce numéro aux bureaux de vente habituels du Bulletin contre paiement de F 40,— ou de f 2,75 par exemplaire.

Les feuillets de ce numéro ne sont donc pas destinés à être insérés dans les Textes de Base Benelux.

BESCHIKKING
VAN HET COMITE VAN MINISTERS
VAN 17 OKTOBER 1980
BETREFFENDE DE TOEPASSING
VAN BENELUX-REFERENTIEMETHODEN VAN ONDERZOEK
INZAKE EETBARE OLIEN

M (80) 5

(inwerkingtreding op 1 oktober 1980)
(voor Beschikking M (73) 29 : zie blz. 1795)

DECISION
DU COMITE DE MINISTRES
DU 17 OCTOBRE 1980
CONCERNANT L'APPLICATION
DE METHODES D'ANALYSE DE REFERENCE BENELUX
RELATIVES AUX HUILES COMESTIBLES

M (80) 5

(entrée en vigueur le 1^{er} octobre 1980)
(pour la Décision M (73) 29 : voir p. 1795)

BESCHIKKING
van het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie
betreffende de toepassing van Benelux-referentiemethoden van onderzoek
inzake eetbare oliën
M (80) 5

Het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie,

Gelet op artikel 1 van het Protocol van 29 april 1969, inzake de afschaffing van controles en formaliteiten aan de binnengrenzen van Benelux en inzake de opheffing van de belemmeringen van het vrije verkeer,

Gelet op de Beschikking van het Comité van Ministers van 31 augustus 1973 inzake de harmonisatie der wetgevingen inzake eetbare oliën, M (73) 29,

Overwegende, dat geschillen, voortvloeiende uit het toepassen van verschillende analysemethoden of uit het gebruik van verschillende normen, dienen te worden vermeden,

Overwegende, dat het in het bijzonder voor de harmonisatie van het voedingsmiddelen toezicht vereist is, dat gelijke of gelijkwaardige methoden worden toegepast, dezelfde termen worden gebezigd en gelijke of gelijkwaardige normen worden aangelegd,

Heeft het volgende beslist :

Enig artikel

1. De Regeringen van de drie Beneluxlanden nemen de nodige maatregelen opdat de bepalingen van het aan deze Beschikking gehechte Reglement, als enige referentiemethode op 1 oktober 1980 worden aanvaard.
2. Uiterlijk 6 maanden na afloop van de in het eerste lid genoemde termijn brengt ieder der drie Regeringen verslag uit aan het Comité van Ministers over de maatregelen die zijn getroffen ter uitvoering van onderhavige Beschikking. Bij dit verslag zal de tekst van de nationale uitvoeringsmaatregelen worden gevoegd.

GEDAAN te Brussel, op 17 oktober 1980.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

G. THORN

DECISION
du Comité de Ministres de l'Union économique Benelux
concernant l'application de méthodes d'analyse de référence Benelux
relatives aux huiles comestibles
M (80) 5

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu l'article 1^{er} du Protocole du 29 avril 1969, relatif à la suppression des contrôles et formalités aux frontières intérieures du Benelux et à la suppression des entraves à la libre circulation,

Vu la Décision du Comité de Ministres du 31 août 1973, relative à l'harmonisation des législations relatives aux huiles comestibles, M (73) 29,

Considérant qu'il y a lieu d'éviter des contestations nées de l'application de techniques d'analyse différentes ou de l'emploi de normes différentes,

Considérant qu'en particulier l'harmonisation du contrôle des denrées alimentaires exige la mise en œuvre de techniques identiques ou équivalentes et l'emploi de modes d'expression semblables et le recours à des normes identiques ou équivalentes,

A pris la décision suivante :

Article unique

1. Les Gouvernements des trois pays du Benelux prendront les mesures nécessaires pour que les dispositions reprises dans le Règlement annexé à la présente Décision soient considérées à partir du 1^{er} octobre 1980 comme seule méthode de référence.
2. Dans les 6 mois qui suivent l'expiration du délai prévu au § 1, chacun des trois Gouvernements fait rapport au Comité de Ministres sur les mesures qui ont été prises pour l'exécution de cette Décision. Le texte des mesures d'exécution nationales sera joint à ce rapport.

FAIT à Bruxelles, le 17 octobre 1980.

Le Président du Comité de Ministres,

G. THORN

n (80) 5

Bijlage/Annexe

REFERENTIEMETHODEN VAN ONDERZOEK INZAKE EETBARE OLIEN

METHODES D'ANALYSE DE REFERENCE RELATIVES AUX HUILES COMESTIBLES

REFERENTIEMETHODEN VAN ONDERZOEK INZAKE EETBARE OLIENI. Antioxydanten1. Kwalitatief onderzoek1.1. Apparaatuur

Gebruikelijke laboratorium hulpmiddelen, evenals :

1. Ontwikkelbak voor dunnelaagchromatografie, geschikt voor dunnelaagplaten van 200 x 200 mm.
2. Dunnelaagplaten 200 x 200 mm, voorzien van Macherey en Nagel (*) kiezelgel G-HR of gelijkwaardig, laagdikte 0,40 mm. Weeg 30 g. M en N kiezelgel G-HR af in een conische kolf met ingeslepen glazen stop van 300 ml, voeg 60 ml gedestilleerd water toe, plaats de stop op de kolf en homogeniseer de kolfinhoud gedurende 1 minuut op een schudmachine. Strijk de suspensie uit met behulp van een uitstrijkapparaat op de dunnelaagplaten van 200 x 200 mm, zodanig dat een laagdikte van 0,40 mm ontstaat. Laat de platen één nacht aan de lucht drogen en bewaar ze in een exsiccator boven silicagel. Aktiveer de platen vlak voor het gebruik door ze 1 uur in een droogstoof van 60° C te plaatsen.
3. Rotatieverdamer.
4. Elektrisch verwarmde droogstoof, goed ventileerbaar en ingesteld op 103 ± 2° C.
5. Elektrisch verwarmde droogstoof, goed ventileerbaar en ingesteld op 60 ± 2° C.

1.2. Reagentia

1. Ethanol p.a., absoluut.
2. Petroleumether, kooktraject 40-60° C.
3. Acetonitril p.a.
4. Benzeen p.a.
5. IJsazijn p.a.
6. Methanol p.a., absoluut.
7. n-Propylgallaat (PG)
8. n-Octylgallaat (OG)
9. n-Dodecylgallaat (DG)

(*) Het vermelden van handels- en/of merknamen vormt geen aanbeveling doch dient alleen ter identificatie.

METHODES D'ANALYSE DE REPERENCE RELATIVES AUX HUILES COMESTIBLES

I. Antioxydants

1. Analyse qualitative

1.1. Appareillage

Accessoires usuels de laboratoire ainsi qu' :

1. Cuve de développement pour chromatographie sur couche mince, convenant pour des plaques à couche mince de 200 x 200 mm.
2. Plaques à couche mince de 200 x 200 mm, couvertes de gel de silice Mcherey et Nagel G-HR (*) ou équivalent, épaisseur de la couche 0,40 mm. Dans un vase conique à bouchon rôdé de 300 ml, peser 30 gr de gel de silice M et N G-HR et ajouter 60 ml d'eau distillée, boucher le vase et homogénéiser son contenu pendant une minute sur un agitateur mécanique. A l'aide d'un appareil approprié, étendre la suspension sur l'une des plaques de 200 x 200 mm de manière à obtenir une couche de 0,40 mm d'épaisseur. Laisser sécher les plaques à l'air pendant une nuit et les conserver dans un exciccateur au-dessus de gel de silice.
Activer extemporanément les plaques en les plaçant pendant une heure dans une étuve à 60° C.
3. Evaporateur rotatif.
4. Etuve électrique, bien ventilable et réglable à 103 ± 2° C.
5. Etuve électrique, bien ventilable et réglable à 60 ± 2° C.

1.2. Réactifs

1. Ethanol p.a. absolu.
2. Ether de pétrole, point d'ébullition 40-60° C.
3. Acétonitrile p.a.
4. Benzène p.a.
5. Acide acétique p.a.
6. Méthanol p.a. absolu.
7. Gallate de propyle n (PG)
8. Gallate d'octyle n (OG)
9. Gallate de dodécyle n (DG)

(*) La mention de marques commerciales ne constitue pas une recommandation mais sert uniquement d'identification.

10. Asoorbylpalmitaat (AP)
11. 3-t-Butyl-4-hydroxyanisool (BHA)
12. 3,5-di-t-Butyl-4-hydroxyanisool (DBHA)
13. 3,5-di-t-Butyl-4-hydroxytolueen (BHT)
14. t-Butylhydrochinon (TBH)
15. Acetonitril, met petroleumether verzadigd.
Breng 900 ml acetonitril p.a. in een 1000 ml fles, voeg 100 ml petroleumether 40-60° C en een weinig CaCl₂ toe, meng, plaats de stop op de fles en laat een nacht staan.
16. Petroleumether (40-60), met acetonitril verzadigd. Breng 900 ml petroleumether (40-60) in een 1000 ml fles, voeg 100 ml acetonitril p.a. en een weinig CaCl₂ toe, meng, plaats de stop op de fles en laat een nacht staan.
17. Spuitreagens ; 0,5 % (m/v) oplossing van 2,6-dichloorchinonchlorimide in absolute ethanol p.a. Los 500 mg 2,6-dichloorchinonchlorimide op in 100 ml absolute ethanol p.a.
18. Ontwikkelvloeistof, meng vlak voor het gebruik 2 volumedelen petroleumether (40-60) met 2 volumedelen benzeen p.a. en 1 volumedeel ijsazijn p.a.

1.3. Referentie-oplossingen

1. Los van elk der onder 1.2.7. tot en met 1.2.13. genoemde anti-oxydanten 100 mg op in methanol (1.2.5.), vul met methanol in een 100 ml maatkolf tot de maatstreep aan en meng ; 0,1 %-ige (m/v) oplossing.
2. Maak op de wijze aangegeven onder 1.3.1. voor t-butylhydrochinon een 0,2 %-ige (m/v) oplossing.

1.4. Isolatie

1. Los 7,5 à 10 gram olie of vet op in 100 ml petroleumether 40-60 en breng de oplossing over in een scheitrechter van 500 ml.
2. Spoel het gebruikte glaswerk met 25 ml met petroleumether verzadigd acetonitril (1.2.15.) en voeg de spoelvloeistof bij de inhoud van de scheitrechter (1.4.1.). Schud gedurende één minuut en laat de acetonitril fase (onderste fase) af in een scheitrechter van 250 ml.

OPMERKING :

Eventueel optredende emulsies kunnen gemakkelijk worden gebroken door de acetonitril fase onder voorzichtig omzwenken te verwarmen onder stromend water van circa 50° C.

10. Palmitate d'ascorbyle (AP)
11. 3-t-Butyl-4-hydroxyanisol (BHA)
12. 3,5-di-t-Butyl-4-hydroxyanisol (DBHA)
13. 3,5-di-t-Butyl-4-hydroxytoluène (BHT)
14. t-Butylhydroquinone (TBH)
15. Acétonitrile saturé d'éther de pétrole.
Dans un flacon de 1000 ml, déposer 900 ml d'acétonitrile p.a., ajouter 100 ml d'éther de pétrole 40-60° C et un peu de CaCl₂, mélanger, boucher le flacon et laisser reposer pendant une nuit.
16. Ether de pétrole (40-60) saturé d'acétonitrile. Dans un flacon de 1000 ml, déposer 900 ml d'éther de pétrole (40-60), ajouter 100 ml d'acétonitrile p.a. et un peu de CaCl₂, mélanger, boucher le flacon et laisser reposer pendant une nuit.
17. Réactifs à vaporiser. Solution à 0,5 % (m/v) de 2.6-dichlorequinon-chlorimide dans de l'éthanol absolu p.a. Dissoudre 500 mg de 2.6.-dichlorequinonchlorimide dans 100 ml d'éthanol absolu p.a.
18. Liquide de développement : mélanger extemporanément 2 volumes d'éther de pétrole (40-60), 2 volumes de benzène p.a. et 1 volume d'acide acétique p.a.

1.3. Solutions de référence

1. Dissoudre, dans du méthanol (1.2.6.), 100 mg de chacun des anti-oxydants cités de 1.2.7. à 1.2.13., compléter jusqu'au trait à l'aide de méthanol dans un ballon jaugé de 100 ml et mélanger ; solution à 0,1 % (m/v).
2. Préparer selon 1.3.1. une solution à 0,2 % (m/v) de t-butylhydroquinone.

1.4. Isolement

1. Dissoudre 7,5 à 10 gr d'huile ou de graisse dans 100 ml d'éther de pétrole 40-60 et transférer la solution dans une ampoule à décantation de 500 ml.
2. Rincer la verrerie utilisée à l'aide de 25 ml d'acétonitrile saturé d'éther de pétrole (1.2.15.) et ajouter le liquide de rinçage au contenu de l'ampoule à décantation (1.4.1.). Agiter pendant une minute et recueillir la phase d'acétonitrile (couche inférieure) dans une ampoule à décantation de 250 ml.

REMARQUE :

Les émulsions qui se forment éventuellement peuvent aisément être dissociées en chauffant, tout en agitant prudemment, la phase d'acétonitrile dans de l'eau courante à environ 50° C.

3. Herhaal de onder 1.4.2. aangegeven extractie nog driemaal.
4. Schud de verzamelde acetontrilextracten tweemaal uit met telkens 15 ml met acetonitril verzadigde petroleumether 40-60 (1.2.16).
5. Breng het acetontrilextract over in een 150 ml rondbodemkolfje en damp het oplosmiddel aan een rotatieverdamer bij een zo laag mogelijke temperatuur onder vacuüm af. De temperatuur van het waterbad mag niet hoger dan 40° C zijn.
6. Neem het residu op in 2 ml absolute methanol en breng de oplossing over in een klein voorraadflesje. De oplossing moet gefiltreerd worden indien het residu niet geheel in oplossing is gegaan.

OPMERKING :

Bij verwachte antioxydantgehaltenes van minder dan 0,01 % verdient het aanbeveling het residu in 1 ml methanol op te nemen.

1.5. Chromatografie en detectie

1. Breng zoveel ontwikkelvloeistof (1.2.18.) in de ontwikkelbak dat het vloeistofoppervlak ca. 1 cm boven de bodem van de bak staat. Plaats twee stukken filtreerpapier van elk 200 x 200 mm in de bak en sluit deze met het bijbehorende deksel af. Laat de ontwikkelbak ter verzadiging met damp van de loopvloeistof 1 à 2 uur bij kamertemperatuur op een donkere plaats staan.
2. Breng 10 à 20 μ l van het onder 1.4.6. verkregen extract op twee startpunten van een vlak voor het gebruik 1 uur op 60° C geaktiveerde dunnelaagplaat (1.1.2.).
3. Breng vervolgens op zeven andere startpunten telkens 4 μ l van één der onder 1.3.1. en 1.3.2. vermelde referentie-oplossingen op.

OPMERKINGEN :

- De afstand tussen de startpunten en de onderkant van de dunnelaagplaat dient ca. 2 cm te zijn terwijl de afstand tussen de startpunten onderling eveneens ca. 2 cm moet bedragen.
 - Per startpunt kunnen ook meerdere standaardoplossingen gecombineerd worden opgebracht.
4. Trek op 15 cm afstand van de startpunten een lijn evenwijdig aan de startlijn. Plaats de plaat in de ontwikkelbak en ontwikkel de plaat tot de afstand tussen de startlijn en het loopmiddelfront 15 cm bedraagt. Het ontwikkelen van de plaat dient eveneens op een donkere plaats te gebeuren.
 5. Neem de plaat uit de bak en laat aan de lucht drogen.
 6. Besproei de plaat in een zuurkast met de 0,5 % (m/v) oplossing van 2,6-dichloorchinonchloorimide (1.2.17.) en plaats deze vervolgens gedurende 10 à 15 minuten in een droogstof van 103 + 2° C.

OPMERKING :

Voor het zichtbaar maken van de gallaten kan in plaats van 2,6-dichloorchinonchloorimide ook een 1 %-ige (m/v) oplossing van ijzer (III) chloride in water worden gebruikt.

3. Répéter encore 3 fois l'extraction décrite sous 1.4.2.
4. Agiter à deux reprises les extraits recueillis d'acétonitrile, chaque fois avec 15 ml d'éther de pétrole 40-60 saturé d'acétonitrile (1.2.16.).
5. Déposer l'extrait d'acétonitrile dans un ballon à fond rond de 150 ml et évaporer le solvant, sous vide, dans un évaporateur rotatif à la plus basse température possible. La température du bain-marie ne doit pas dépasser 40° C.
6. Reprendre le résidu par 2 ml de méthanol absolu et déposer la solution dans un petit flacon de réserve. La solution doit être filtrée si le résidu n'est pas entièrement passé en solution.

REMARQUE :

Si les teneurs en antioxydants escomptées sont inférieures à 0,01 %, il est recommandable de reprendre le résidu par 1 ml de méthanol.

1.5. Chromatographie et détection

1. Dans la cuve de développement, déposer une quantité de liquide de développement (1.2.18.) telle que la surface du liquide se trouve à environ 1 cm au-dessus du fond de la cuve. Déposer deux feuilles de papier filtre, de 200 x 200 mm chaque, dans la cuve et la fermer à l'aide de son couvercle. Pour assurer la saturation par la vapeur de la phase mobile, laisser la cuve de développement reposer dans l'obscurité pendant une à deux heures à la température ambiante.
2. Déposer 10 et 20 μ l de l'extrait obtenu selon 1.4.6., sur 2 points de départ d'une plaque à couche mince (1.1.2.) activée extemporanément pendant 1 heure à 60° C.
3. Déposer ensuite, sur des points de départ, chaque fois 4 μ l de l'une des solutions de référence mentionnées de 1.3.1. et 1.3.2.

REMARQUES :

- La distance entre les points de départ et le bord inférieur de la plaque à couche mince doit être d'environ 2 cm.
 - Les points de départ doivent également être équidistants de 2 cm environ.
4. A 15 cm des points de départ, tracer une ligne parallèle à la ligne de départ. Placer la plaque dans la cuve et la développer jusqu'à ce que la distance entre la ligne de départ et le front de solvant soit de 15 cm. La plaque doit également être développée dans l'obscurité.
 5. Retirer la plaque de la cuve et la laisser sécher à l'air.
 6. Dans une hotte, vaporiser la plaque à l'aide de la solution à 0,5 % (m/v) de 2,6-dichlorequinonchlorimide (1.2.17.) puis la placer pendant 10 à 15 minutes dans une étuve à 103 ± 2° C.

REMARQUE :

Pour rendre les gallates visibles, on peut, en lieu et place de 2,6-dichlorequinonchlorimide, utiliser une solution aqueuse à 1 % (m/v) de chlorure de fer (III).

7. Neem de plaat uit de droogstof en vergelijk de kleur evenals de Rf-waarden van de vlekken van de referentie-oplossingen met die van het opgebrachte extract.
8. Extra informatie omtrent de identiteit der antioxydanten kan worden verkregen door de tot kamertemperatuur afgekoelde plaat ongeveer 30 seconden in een met ammoniakdampen verzadigde ontwikkelbak te plaatsen.
9. Vergelijk de Rf-waarden x 100 evenals de na bespuiting met 2,6-dichloorchinonchlorimide resp. na behandeling met ammonia waargenomen kleuren resp. kleurveranderingen met de in tabel 1 vermelde gegevens. Aan de in deze tabel vermelde Rf-waarden x 100 mag echter geen absolute waarde toegekend worden omdat de Rf-waarden van plaat tot plaat verschillen.

2. Tocoferolen

2.1. Beginnel

De kwantitatieve extractie van tocoferolen met het onverzeepbare wordt uitgevoerd volgens bestaande voorschriften. (The Analyst 84, 356 (1959) - J.A.O.A.C. 49, 580 (1966).

De afzondering van de sterolen op gestandaardiseerd floriseil zuivert in sterke mate de tocoferolen van storende pieken bij de G.L.C.-analyse.

In de afgezonderde fractie die de totaliteit der tocoferolen bevat kunnen alfa, gamma en delta tocoferol zonder moeilijkheden worden gescheiden. De toevoeging van een inwendige standaard die niet interfereert met aanwezige componenten uit de te onderzoeken fractie laat toe de verhouding te bepalen van de tocoferolen tot de I.S.. De omzetting van de sterol-vrije fractie van het onverzeepbare in trimethyl silyl-derivaten voert tot een goede reproduceerbaarheid der antwoorden en tot een recovery van meer dan 90 % van het toegevoegde tocoferol. De verkregen G.L.C.-antwoorden worden in ponderale verhoudingen omgezet na aflezing op een ijkcurve die met zuivere reactieven wordt opgemaakt.

2.2. Reagentia

1. verse alcoholische pyrogallol opl. 5 % (w/v) in ethanol 96°
2. verse alcoholische KOH opl. (30 ml ethanol + 3 ml KOH opl (3 + 2)
3. ethanol 96°
4. vers gedestilleerde peroxyde en watervrije diethylether

7. Retirer la plaque de l'étuve et comparer sa coloration, de même que les valeurs Rf des taches des solutions de référence, avec celles de l'extrait déposé.
8. Des informations supplémentaires au sujet de l'identité des anti-oxydants peuvent être obtenues en plaçant, pendant 30 secondes environ, la plaque, refroidie jusqu'à la température ambiante, dans une cuve de développement saturée de vapeur d'ammoniaque.
9. Comparer, aux données figurant au tableau 1, les valeurs Rf x 100 ainsi que les teintes ou les modifications de coloration constatées après vaporisation à l'aide de 2,6.-dichlorequinonchlorimide ou après traitement par l'ammoniaque. Il ne faut toutefois pas attribuer de signification absolue aux valeurs Rf x 100 reprises dans ce tableau, car ces valeurs peuvent quelque peu varier d'une plaque à l'autre.

2. Tocophérols

2.1. Principe

L'extraction quantitative des tocophérols et de l'insaponifiable est exécutée selon les prescriptions existantes. (The Analyst 84, 356 (1959) - J.A.O.A.C. 49, 580 (1966).

La séparation des stérols sur florisil standardisé épure fortement les tocophérols de pics perturbateurs, dans l'analyse G.L.C.

Les tocophérols alpha, gamma et delta peuvent être séparés sans difficulté dans la fraction isolée qui renferme la totalité des tocophérols. L'adjonction d'un standard interne qui n'interfère pas avec les composants présents de la fraction à analyser, permet d'établir le rapport des tocophérols vis-à-vis du I.S. La conversion de la fraction exempte de stérol de l'insaponifiable en dérivés triméthyl silyle conduit à une bonne reproductibilité des réponses et à une récupération de plus de 90 % du tocophérol ajouté. Les réponses G.L.C. obtenues sont converties en rapports pondéraux après lecture sur une courbe d'étalonnage établie à l'aide de réactifs purs.

2.2. Réactifs

1. Solution alcoolique de pyrogallol frais à 5 % (v/v) dans de l'éthanol 96°
2. Solution alcoolique fraîche de KOH (30 ml d'éthanol + 3 ml de solution KOH (3 + 2)
3. Ethanol 96°
4. Ether diéthylique fraîchement distillé, anhydre et exempt de peroxyde

5. gestandaardiseerde florisil : was florisil met water tot afwezigheid van SO_4 . Droog en activeer bij 260° gedurende 2 u. Desaotiveren vervolgens door toevoeging van 10.5 ml water per 100 g florisil. Herhaaldelijk het hermetisch gesloten recipient schudden en overnacht laten staan tot evenwichtsinstelling.
6. Natriumsulfaat, watervrij p.a.
7. Vers gedestilleerde n-hexaan, watervrij (kookp. $68^\circ - 70^\circ$)
8. Chloroform p.a.
9. N, O-bis (trimethylsilyl) acetamide - afg. : B.S.A.
10. Koolstofsulfide p.a.
11. Alfa tocoferol - min 99 % zuiverheid - moet voor meer dan 99 % uit één enkele piek bestaan bij G.L.C.-analyse.
12. Dotriacontaan - moet voor meer dan 99 % uit één enkele piek bestaan bij G.L.C.-analyse.

2.3. Apparatuur en glaswerk

1. gaschromatograaf met regelbare temperatuur voor injectiepoort, oven en F.I.-detector
2. glazen kolom van ca. 2 m lengte en $1/4''$ buiten diameter gevuld met ca. 1 % OV₁₇ op gaschrom Q (100 - 120 mesh). De glazen kolom vooraf silyleren, zorgvuldig vullen met stationaire fase en de opstelling uitvoeren voor de "on-column injection"
3. injectie spuit van 10 microliters (μ l)
4. Rotavapor voor droogdampen onder stikstof en verminderde druk
5. glazen kolommen van 2,5 cm ϕ voorzien van Teflon kraan
6. scheitrechters van 250 en 500 ml voorzien van Teflon kraan
7. kolfjes van 100 ml voorzien van terugvloei koeler
8. klassiek glaswerk.

2.4. Werkwijze

2.4.1. verzeeping van de olie en extractie van het onverzeepbare

1. veeg 5 g olie in een kolfje van 100 ml en voeg 20 ml pyrogallol opl. toe
2. verwarm op waterbad onder terugvloei koeler en voeg bij kooktemperatuur 30 ml alk. KOH opl. toe. Verzeep gedurende 20 min.
3. breng de nog warme opl. in een scheitrechter van 250 ml m.b.v. 100 ml water.

5. Florisil standardisé : laver du florisil à l'eau jusqu'à disparition du SO_2 . Sécher et activer à 260° pendant deux heures. Désactiver ensuite en ajoutant 10,5 ml d'eau par 100 g de florisil Agiter à plusieurs reprises le récipient hermétiquement fermé et le laisser reposer une nuit jusqu'à équilibre.
6. Sulfate de sodium anhydre p.a.
7. Hexane n fraîchement distillé, anhydre (point d'ébullition 68° - 70°)
8. Chloroforme p.a.
9. N, O-bis (triméthylsilyl) acétamide - en abrégé : B.S.A.
10. Sulfure de carbone p.a.
11. Tocophérol alpha - pureté 99 % min. - doit être constitué à plus de 99 % d'un seul pic dans l'analyse G.L.C.
12. Dotriacontane - doit être constitué à plus de 99 % d'un seul pic dans l'analyse G.L.C.

2.3. Appareillage et verrerie

1. Chromatographe en phase gazeuse à température réglable pour l'injection, four et détecteur F.I.
2. Colonne de verre d'environ 2 m de longueur et de diamètre extérieur 1/4" remplie d'OV₁ environ 1 % sur gaschrom Q (100 - 120 mesh). Silaniser préalablement la colonne de verre, la remplir soigneusement de phase stationnaire et aménager pour "on-column injection".
3. Pipette d'injection de 10 microlitres (11)
4. Evaporateur rotatif pour évaporation à sec sous azote et pression réduite.
5. Colonnes de verre de 2,5 cm Ø, pourvues d'un robinet en téflon.
6. Ampoules à décanter de 250 et 500 ml, pourvues d'un robinet en téflon.
7. Ballons de 100 ml pourvus d'un réfrigérant à reflux.
8. Verrerie classique.

2.4. Mode opératoire

2.4.1. saponification de l'huile et extraction de l'insaponifiable

1. Peser 5 g d'huile dans un ballon de 100 ml et ajouter 20 ml de solution de pyrogallol.
2. Chauffer au bain-marie sous réfrigérant à reflux et ajouter, à température d'ébullition, 10 ml de solution KOH alcoolique. Saponifier pendant 20 minutes.
3. Transférer la solution encore chaude dans une ampoule à décanter de 250 ml, à l'aide de 100 ml d'eau.

4. extraheer het onverzeepbare met 100 ml diethylether. Bij slechte scheiding voeg 1 à 2 ml ethanol toe. Na volledige opklaring, de etherlaag in een tweede scheitrichter van 500 ml gieten, waarin reeds 40 ml water werd gebracht.
5. extraheer nog 2 x de zeepglossing met 100 ml diethylether en voeg de extracten samen
6. meng voorzichtig de extracten met het water en vermijd de vorming van emulsies.
7. was verder telkens met 40 ml water tot neutrale reactie t.o.v. fenolftaleïne.
8. breng de ether-oplossing in een kolf en destilleer het grootste gedeelte van de ether onder verminderde druk en in stikstofatmosfeer.
9. droog het residu door filtratie op een kleine kolom met watervrij natriumsulfaat. Na wassen met ether wordt verder droog-gedaapt.

24.2. fractionnering van het onverzeepbare op florisiilkolom

1. vul een kolom met hexaan en giet door een trechter 30 g gedeseactiveerd floriseil in het hexaan.
Breng, na decantatie, een paar cm. natriumsulfaat aan de oppervlakte
2. laat het overtollige hexaan druppelsgewijze doorvloeien en breng het onverzeepbare, na oplossen in een paar ml. chloroform, aan de oppervlakte van de kolom. Laat de chloroform in de kolom sijpelen en spoel na
3. elueer achtereenvolgens met :
40 ml hexaan
120 ml oplossing van 5 % (v/v) diethylether in hexaan
120 ml " " 15 % (v/v) " "
Laat elke oplossing, achtereenvolgens druppelsgewijze, door de kolom sijpelen en recupereer de eluaten in één enkel recipient.
4. destilleer het overgroot gedeelte van het oplosmiddel onder verminderde druk en onder stikstofatmosfeer.
5. voeg een juist afgemeten volume toe van een oplossing van dotriacontaan in diethylether, zodat een gekende hoeveelheid invendige standaard (ong. 20 mg) aan de tocoferolfractie wordt toegevoegd.
6. homogeniseer de inhoud van de kolf door enkele omzwenkingen en giet over in een klein kolfje een hoeveelheid die ongeveer 20 mg droge stof bevat.

4. Extraire l'insaponifiable par 100 ml d'éther diéthylique. En cas de mauvaise séparation, ajouter 1 à 2 ml d'éthanol. Après clarification complète, verser la couche éthérée dans une deuxième ampoule à décantier de 500 ml, contenant déjà 40 ml d'eau.
5. Extraire encore deux fois la solution saponifiée par 100 ml d'éther diéthylique et rassembler les extraits.
6. Mélanger prudemment les extraits avec de l'eau en évitant la formation d'émulsions.
7. Laver chaque fois par 40 ml d'eau jusqu'à réaction neutre en présence de phénolphtaléine.
8. Transférer la solution éthérée dans un ballon et distiller la majeure partie de l'éther sous pression réduite et en atmosphère d'azote.
9. Sécher le résidu par filtration sur une petite colonne avec du sulfate de sodium anhydre. Evaporer à sec, après lavage à l'éther.

2.4.2. Fractionnement du non-saponifiable sur colonne de florisil

1. Remplir une colonne à l'aide d'hexane et, par un entonnoir, verser 30 g de florisil désactivé dans l'hexane. Après décantation, déposer quelques cm de sulfate de sodium à la surface.
2. Laisser s'écouler, goutte à goutte, l'excès d'hexane et déposer l'insaponifiable sur la surface de la colonne, après l'avoir dissous dans quelques ml de chloroforme. Laisser le chloroforme ruisseler dans la colonne et laver.
3. Eluer successivement à l'aide de :
 - 40 ml d'hexane
 - 120 ml de solution d'éther diéthylique 5 % (v/v) dans de l'hexane
 - 120 ml de solution d'éther diéthylique 15 % (v/v) dans de l'hexaneLaisser successivement ruisseler, goutte à goutte, chacune des solutions dans la colonne et récupérer les éluats dans un seul récipient.
4. Distiller la majeure partie du solvant sous pression réduite et en atmosphère d'azote.
5. Ajouter un volume exactement mesuré d'une solution de docriacontane dans de l'éther diéthylique, de manière à ajouter à la fraction de tocophérol une quantité connue de standard interne (environ 20 mg).
6. Homogénéiser le contenu du ballon en l'agitant à quelques reprises et verser, dans un petit ballon, une quantité renfermant environ 20 mg de matière sèche.

7. verjaag het solvent met een matige stikstofstroom die op de oppervlakte van de vloeistof blaast en dit bij lichte verwarming van het kolfje
8. voeg aan de droogrest 1 ml B.S.A. toe en plaats het met een glazen stop gesloten kolfje gedurende 2 u in de droogstoof bij 70 °.
9. verjaag met een matige stikstofstroom, zoals onder 2.4.2.7., het overschot van B.S.A.
10. los de verdamprest op in 1 ml koolstofsulfide en plaats het gesloten kolfje in de koelkast in afwachting van de G.L.C.-analyse.

2.4.3. G.L.C.-analyse van de tocoferolfraction

1. stel de gaschromatograaf in bij volgende temperaturen en regel de gasdebieten als volgt :

temp. oven : 240°

" injector : 260°

" detector : 260°

stikstof (dragergas) : ca. 30 ml/min.

waterstof : ca. 30 ml/min.

2. weeg nauwkeurig in vier verschillende kolfjes een mengsel af van alfa tocoferol en dotriacontaan zodat ongeveer volgende ponderale verhoudingen dotriacontaan/tocopherol worden verzeenlijkt : 3, 2, 1 en 0,5

Bij het gebruik van een microbalans wordt telkens ca. 10 mg alfa tocoferol afgewogen en het gewicht dotriacontaan aangepast

3. silyleer de mengsels zoals onder 2.4.2.8.
4. verjaag het overschot van reactief zoals onder 2.4.2.9.
5. los de verdampresten op zoals onder 2.4.2.10.
6. injecteer 1 microliter (μ l) van deze oplossingen en regel de gevoeligheid van de electrometer en de papierenheid van de recorder zodat de integratie van de pieken in optimale voorwaarden mogelijk wordt. Bereken de verhouding der pieken.
7. herhaal, ten minste voor één oplossing, de injecties een voldoende aantal keren om de berekening van de standaard afwijking mogelijk te maken. Indien $\frac{S}{\bar{x}} \times 100$ 2 % niet overschrijdt mag de reproduceerbaarheid als bevredigend worden beschouwd.
8. zet de verkregen waarden van de verhoudingen der oppervlakten uit tegen de ponderale verhoudingen voor de verschillende standaard oplossingen. Trek de ijklijn die normaliter een rechte moet benaderen.

7. Chasser le solvant à l'aide d'un courant modéré d'azote soufflant à la surface du liquide, tout en chauffant légèrement le ballon.
8. Ajouter au résidu sec 1 ml de B.S.A. et le placer, dans un ballon fermé par un bouchon de verre, pendant deux heures à l'étuve à 70°.
9. Chasser l'excès de B.S.A. par un courant modéré d'azote comme sous 2.4.2.7.
10. Dissoudre le résidu d'évaporation dans 1 ml de sulfure de carbone et placer le ballon bouché au réfrigérateur en attendant l'analyse G.L.C.

2.4.3. Analyse G.L.C. de la fraction de tocophérol

1. Entreprendre la chromatographie en phase gazeuse aux températures suivantes et régler comme suit les débits de gaz :
Température four : 240°
" injecteur : 260°
" détecteur : 260°
Azote (gaz vecteur) : environ 30 ml/min.
hydrogène : environ 30 ml/min.
2. Dans quatre ballons différents, peser soigneusement un mélange de tocophérol alpha et de dotriacontane, de manière à réaliser à peu près les rapports pondéraux dotriacontane/tocophérol suivants : 3, 2, 1 et 0,5.

En utilisant une microbalance, peser chaque fois environ 10 mg de tocophérol alpha et y adapter le poids de dotriacontane.
3. Silyler les mélanges selon 2.4.2.8.
4. Chasser l'excès de réactif selon 2.4.2.9.
5. Dissoudre les résidus d'évaporation selon 2.4.2.10.
6. Injecter 1 microlitre (μ l) de ces solutions et régler la sensibilité de l'électromètre et la vitesse du papier de l'enregistreur de manière à permettre l'intégration des pics aux conditions optimales. Calculer le rapport des pics.
7. Répéter plusieurs fois les injections, au moins pour l'une des solutions, en nombre suffisant pour permettre le calcul de la déviation standard. Si $\frac{S \times 100}{\bar{x}}$ n'excède pas 2 %, la reproductibilité peut être considérée comme satisfaisante.
8. Exprimer les valeurs obtenues des rapports des surfaces en relations pondérales pour les diverses solutions de référence. Etablir la courbe d'étalonnage qui, normalement, doit approcher une droite.

9. voor de injecties uit met de onbekende extracten uit de olie. De relatieve retentietijden t.o.v. dotriacontaan zijn ongev. als volgt :

voor alfa tocoferol : 0,82
bêta en gamma tocoferol : 0,67
delta tocoferol : 0,55

10. indien twijfel bestaat nopens mogelijke interferentie van de inwendige standaard met pieken uit het onverzeepbare, kan steeds de injectie worden uitgevoerd van het gesilyleerde extract zonder toevoeging van de I.S.

11. indien twijfel bestaat nopens de interferentie van bepaalde tocoferolpieken met andere componenten uit het onverzeepbare, kan de injectie ook plaatsvinden vóór silylering hetgeen tot andere retentietijden voert.

2.4.4. Berekening

1. bereken de verhouding der oppervlakten van de inwendige standaard t.o.v. de tocoferolpieken uit de te onderzoeken olie
2. lees uit de verhouding der oppervlakten de ponderale verhouding af op de ijklijn
3. bereken als volgt het totaalgehalte aan tocoferolen

$$\% \text{ tocoferolen} = \frac{\text{ingewogen dotriacontaan}}{\text{ponderale verhouding}} \times \frac{100}{\text{ingewogen olie}}$$

OPMERKING : Men kan aannemen dat het specifiek antwoord van de verschillende tocoferolen gelijkaardig is als dit van alfa tocoferol en dat de ijklijn, met deze stof getrokken, ook van toepassing is voor de andere pieken.

9. Effectuer les injections à l'aide des extraits inconnus de l'huile. Les temps relatifs de rétention par rapport au dotriacontane sont d'environ :

Pour le tocophérol alpha : 0,82

Tocophérol bêta et gamma : 0,67

Tocophérol delta : 0,55

10. En cas de doute au sujet de l'interférence possible de la référence interne avec des pics de l'insaponifiable, il est toujours possible d'effectuer l'injection de l'extrait silylé, sans adjonction d'I.S.

11. En cas de doute au sujet de l'interférence de certains pics de tocophérol avec d'autres composants de l'insaponifiable, l'injection peut également s'effectuer avant la silylation, ce qui conduit à d'autres temps de rétention.

2.4.4. Calcul

1. Calculer le rapport des surfaces du standard interne par rapport aux pics de tocophérol de l'huile à analyser.
2. Du rapport des surfaces, lire la relation pondérale sur la courbe d'étalonnage.
3. Calculer comme suit la teneur totale en tocophérols

$$\% \text{ tocophérols} = \frac{\text{dotriacontane mis en oeuvre}}{\text{relation pondérale}} \times \frac{100}{\text{huile mise en oeuvre}}$$

REMARQUE : On peut admettre que la réponse spécifique des différents tocophérols est analogue à celle du tocophérol alpha et que la courbe d'étalonnage, établie à l'aide de cette substance, s'applique également aux autres pics.

3. Butylhydroxyanisol (BHA, kwantitatief)

3.1. Reagentia en apparatuur

Indien niet uitdrukkelijk anders vermeld dienen alle reagentia van een zo zuiver mogelijke kwaliteit te zijn.

- Natriumsulfaat, watervrij
- Olijfolie ; vrij van antioxydanten (Oleum Olivae, Ned.Ph.Ed.VI)
- 3-BHA (*) ; 3-tert.butyl-4-hydroxyanisol
- Florisil, 60-100 mesh. vochtgehalte, bepaald door middel van Karl Fischer titratie ongeveer 3 % (m/m)
- Petroleumether-aceton mengsel. Meng 100 ml aceton en 900 ml petroleumether (40-60° C)
- Zoutzuur, 3 n
- Natriumnitrietoplossing 2 % (m/v). Bereid de oplossing elke week vers.
- Natriumhydroxyde oplossing. Los 40 gram natriumhydroxyde op in 500 ml gedistilleerd water en voeg 50 ml methanol toe. Meng, breng het volume met water op één liter en meng opnieuw.
- Chromatografie kolom ; leng 400 mm, inwendige diameter 20 mm. Breng onder in de kolom een laagje gesilaniseerde glaswol aan en vul de kolom vervolgens met zoveel Florisil dat een Florisil-kolom van 4 cm lang is ontstaan. Dek de Florisil-kolom af met een laag van 1 à 1½ cm watervrij natriumsulfaat.
- Spectrofotometer, geschikt voor het meten bij 480 nm.

3.2. Werkwijze

1. Breng 10 gram (a gram) tot op 1 mg nauwkeurig gewogen monster kwantitatief over in een 150 ml scheitrichter en voeg 50 ml petroleumether-aceton mengsel toe.
2. Pipetteer achtereenvolgens 5 ml natriumnitrietoplossing en 5 ml zoutzuur 3 n in de scheitrichter, sluit de scheitrichter onmiddellijk met de bijpassende stop en schud krachtig gedurende 30 sec.
3. Laat na het scheiden der fasen de waterige fase af en extraheer de organische fase tweemaal met achtereenvolgens 20 en 5 ml natriumhydroxyde-oplossing door telkens gedurende 30 sec. krachtig te schudden. Verzamel de alkalische extracten in een 150 ml scheitrichter waarin zich 15 ml zoutzuur 3 n bevindt.

(*) Het in de handel verkrijgbare BHA is een mengsel van 2- en 3-tert.butyl-4-hydroxyanisol. Het verschil in absorptie maximum en molaire absorptie tussen de nitrosoderivaten van beide isomeren is verwaarloosbaar klein.

3. Butylhydroxyanisol (BHA, quantitatif)

3.1. Réactifs et appareillage

Sauf mention contraire expresse, tous les réactifs doivent être d'une qualité aussi pure que possible.

- Sulfate de sodium anhydre
- Huile d'olive exempte d'antioxydants (Oleum Olivae, Ned.Ph.Ed.VI)
- 3-BHA (*) ; 3-tert.butyle-4-hydroxyanisol
- Florisile, 60-100 mesh. Teneur en humidité déterminée par la titration Karl Fischer, environ 3 % (m/m)
- Mélange d'éther de pétrole-acétone. Mélanger 100 ml d'acétone et 900 ml d'éther de pétrole (40 - 60° C)
- Acide chlorhydrique 3 n
- Solution de nitrite de sodium 2 % (m/v). Préparer une solution fraîche chaque semaine.
- Solution d'hydroxyde de sodium. Dissoudre 40 grammes d'hydroxyde de sodium dans 500 ml d'eau distillée et ajouter 50 ml de méthanol. Mélanger, porter le volume à un litre avec de l'eau et mélanger à nouveau.
- Colonne pour chromatographie : longueur 400 mm, diamètre intérieur 20 mm. Déposer au fond de la colonne une petite couche de laine de verre silanisée et puis remplir la colonne de Florisile de manière à obtenir une colonne de Florisile de 4 cm de longueur. Recouvrir la colonne de Florisile d'une couche de sulfate de sodium anhydre de 1 à 1 ½ cm.
- Spectrophotomètre convenant pour la mesure à 480 nm.

3.2. Mode opératoire

1. Transférer quantitativement dans une ampoule à décantation de 150 ml, 10 grammes d'échantillon pesés à 1 mg près (à gramme) et ajouter 50 ml de mélange d'éther de pétrole-acétone.
2. Pipeter successivement 5 ml de solution de nitrite de sodium et 5 ml d'acide chlorhydrique 3 n dans l'ampoule à décantation, la fermer immédiatement à l'aide du bouchon approprié et agiter énergiquement pendant 30 secondes.
3. Evacuer la phase aqueuse après séparation des couches et extraire à deux reprises la phase organique successivement avec 20 et 5 ml de solution d'hydroxyde de sodium en agitant chaque fois énergiquement pendant 30 secondes. Recueillir les extraits alcaline dans une ampoule à décantation de 150 ml renfermant 15 ml d'acide chlorhydrique 3 n.

(*) Le BHA vendu dans le commerce est un mélange de 2- et 3-tert. butyle-4-hydroxyanisol. La différence en absorption maximale et absorption molaire entre les dérivés nitroso des deux isomères est faible au point d'être négligeable.

4. Extraheer de waterige oplossing (3.2.3.) met 25 ml petroleumether-aceton mengsel, laat de waterige fase af in een 150 ml scheitrichter en breng de organische fase op de Florisil-kolom.
5. Extraheer de waterige fase (3.2.4.) nogmaals met 25 ml petroleumether-aceton mengsel en breng ook deze organische fase op de Florisil-kolom zodra het eerste extract (3.2.4.) de bovenkant van de kolom-vulling praktisch heeft bereikt.
6. Verzamel het eluaat van de Florisil-kolom (3.2.4. en 3.2.5.) in een 150 ml scheitrichter. Spoel de onder 3.2.4. en 3.2.5. gebruikte scheitrichters met 25 ml petroleumether-aceton mengsel en breng de spoelvloeistof zodra het tweede extract (3.2.5.) de bovenrand van de kolomvulling heeft bereikt eveneens op de Florisil-kolom en elueer. Vang ook dit eluaat op in de 150 ml scheitrichter.
7. Pipetteer 40 ml natriumhydroxyde-oplossing in de scheitrichter (3.2.6.), schud krachtig gedurende 30 sec. en breng na het schudden der fasen een deel van de alkalische fase over in een 1 cm cuvet.
8. Meet de extinctie van de oplossing bij 480 nm tegen natriumhydroxyde-oplossing als referentie en lees de bijbehorende hoeveelheid butylhydroxyanisol in μg per ml meetoplossing (b) af op de ijklijn (3.3.3.).

3.3. Ijklijn

1. Bereid een oplossing van butylhydroxyanisol in petroleumether-aceton mengsel die 100 μg per ml bevat.
2. Breng in een vijftal 150 ml scheitrichters 10 gram olijfolie en pipetteer in elk der scheitrichters respectievelijk 0, 1, 2, 5 en 10 ml standaardoplossing (3.3.1.). Voeg aan iedere scheitrichter in dezelfde volgorde als voorheen toe 50, 49, 48, 45 en 40 ml petroleumether-aceton mengsel en meng.
3. Behandel de oplossingen zoals aangegeven onder 3.2.2. tot en met 3.2.8., neem in plaats van de voorgeschreven 40 ml natriumhydroxyde-oplossing (3.2.7.) slechts 20 ml en zet de extincties gemeten voor de standaardoplossingen grafisch uit als functie van de butylhydroxyanisol concentratie in μg per ml meetoplossing. Trek de best passende lijn door de meetpunten.

4. Extraire la solution aqueuse (3.2.3) à l'aide de 25 ml de mélange d'éther de pétrole-acétone, évacuer la phase aqueuse dans une ampoule à décantation de 150 ml et transférer la phase organique sur la colonne de Florisile.
5. Extraire une nouvelle fois la phase aqueuse (3.2.4.) à l'aide de 25 ml de mélange d'éther de pétrole-acétone et transférer également cette phase organique sur la colonne de Florisile dès que le premier extrait (3.2.4.) a pratiquement atteint la surface du contenu de la colonne.
6. Recueillir l'éluat de la colonne de Florisile (3.2.4. et 3.2.5.) dans une ampoule à décantation de 150 ml. Rincer les ampoules à décantation utilisées sous 3.2.4. et 3.2.5. à l'aide de 25 ml de mélange d'éther de pétrole-acétone et transférer également sur la colonne de Florisile le liquide de rinçage dès que le deuxième extrait (3.2.5.) a atteint la surface du contenu de la colonne, éluer. Recueillir également cet éluat dans l'ampoule à décantation de 150 ml.
7. Pipeter 40 ml de solution d'hydroxyde de sodium dans l'ampoule à décantation (3.2.6.), agiter énergiquement pendant 30 secondes et, après séparation des phases, transférer une partie de la phase alcaline dans une cuvette de 1 cm.
8. Mesurer l'extinction de la solution à 480 nm en présence de solution d'hydroxyde de sodium comme référence et noter, sur la courbe d'étalonnage (3.3.3.) la quantité afférente de butylhydroxyanisol en μg par ml de solution de mesure (b).

3.3. Courbe d'étalonnage

1. Préparer une solution de butylhydroxyanisol dans un mélange d'éther de pétrole-acétone renfermant 100 μg par ml.
2. Dans 5 ampoules à décantation de 150 ml, déposer 10 grammes d'huile d'olive et pipeter dans chacune des ampoules respectivement 0, 1, 2, 5 et 10 ml de solution de référence (3.3.1.). Ajouter à chaque ampoule à décantation, dans le même ordre de succession que ci-dessus, 50, 49, 48, 45 et 40 ml de mélange d'éther de pétrole-acétone et mélanger.
3. Traiter la solution selon 3.2.2. à 3.2.8., en ne prenant que 20 ml au lieu des 40 ml prescrits de solution d'hydroxyde de sodium (3.2.7.) et exprimer graphiquement les extinctions mesurées pour les solutions de référence comme fonction de la concentration de butylhydroxyanisol en μg par ml de solution mesurée. Tracer la ligne la plus appropriée par les points de mesure.

3.4. Berekening

1. Bereken het butylhydroxyanisol gehalte van het monster in %
(a/m) met behulp van de formule

$$\frac{b}{a} \times 250$$

waarin :

a = de inweeg van het monster in grammen (3.2.1.)

b = de hoeveelheid butylhydroxyanisol in µg per ml meetoplossing
afgelezen op de ijklijn (3.2.8.).

4. BHT

De bepaling van BHT zal in een latere beschikking worden geregeld.

3.4. Calcul

1. Calculer la teneur en pour-cent (m/m) de butylhydroxyanisol dans l'échantillon par la formule

$$\frac{b}{a} \times 250$$

où :

a = le poids, en grammes, de l'échantillon mis en oeuvre (3.2.1.)

b = la quantité de butylhydroxyanisol en μg par ml de solution mesurée notée sur la courbe d'étalonnage (3.2.8.).

4. BHT

La détermination du BHT sera réglée dans une décision ultérieure.

II. Kleurstoffen

Zie Beschikking M (76) 11 inzake de toepassing van een Benelux-referentiemethode voor het opsporen en het identificeren van in levensmiddelen aanwezige in vet oplosbare synthetische kleurstoffen.

III. Anti-schuimmiddel

De bepaling van dimethylpolysiloxaan volgt.

IV. Zuurgetal en vrije vetzuren

Zuurgetal

Onder het zuurgetal wordt verstaan het aantal milligrammen kaliumhydroxide, nodig om de vrije vetzuren aanwezig in 1 gram olie of vet te neutraliseren.

Reagentia :

- Mengsel van ethanol en ether.
Meng gelijke volumina ethanol 96 % v/v en diëthylether.
Neutraliseer dit mengsel onmiddellijk voor het gebruik met behulp van 0,1 n kaliumhydroxide in ethanol na toevoeging van 0,5 ml indicatoroplossing per 100 ml van het mengsel.
- 0,1 n kaliumhydroxide in ethanol 96 % v/v.
Stel de titer van deze oplossing vlak voor het gebruik.
De oplossing dient tenminste 5 dagen tevoren te zijn bereid en gedecanteerd in een donkere fles met rubber stop.
De oplossing moet kleurloos of strogeel zijn.
Het verdient aanbeveling de voor het bereiden van de oplossing gebruikte ethanol te zuiveren door 1 liter ethanol met 5 à 10 gram kaliumhydroxide gedurende een uur zacht te laten koken en vervolgens af te destilleren.
- 0,5 n kaliumhydroxide in ethanol 96 % v/v.
Zie opmerking gemaakt bij de 0,1 n kaliumhydroxide oplossing.
- Indicator-oplossing : los 1 gram fenolftaleïne op in 100 ml ethanol 96 % v/v.
Voor donkere oliën : los 2 gram alkaliblaauw 6B op in 100 ml ethanol 96 % v/v.

Werkwijze :

1. Weeg in een konische kolf van 250 ml af 5 à 10 gram van het te onderzoeken monster. Weeg tot op 0,01 gram nauwkeurig.

II. Colorants

Voir Décision M (76) 11 concernant l'application d'une méthode de référence Benelux pour la recherche et l'identification des colorants synthétiques liposolubles présents dans les denrées alimentaires.

III. Antimousseant

La détermination du diméthylpolysiloxane suivra.

IV. Degré d'acidité et acides gras libres

Indice d'acide

Par indice d'acide on entend le nombre de mg d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans 1 g d'huile ou de graisse.

Réactifs :

- Mélange d'éthanol et d'éther.

Mélanger des volumes égaux d'éthanol 96 % v/v et d'éther diéthylique. Neutraliser ce mélange immédiatement avant l'emploi à l'aide d'hydroxyde de potassium 0,1 n dans de l'éthanol, après adjonction de 0,3 ml de solution d'indicateur par 100 ml du mélange.

- Hydroxyde de potassium 0,1 n dans de l'éthanol 96 % v/v.

Etablir le titre de cette solution immédiatement avant l'emploi. La solution doit être préparée au moins 5 jours par avant et décantée dans un flacon en verre sombre muni d'un bouchon en caoutchouc. La solution doit être incolore ou jaune paille. Il est recommandable de purifier l'éthanol utilisé pour la préparation de la solution, en faisant bouillir doucement, pendant une heure, 1 l d'éthanol et 5 à 10 g d'hydroxyde de potassium en distillant ensuite.

- Hydroxyde de potassium 0,5 n dans de l'éthanol 96 % v/v.

Comme la solution 0,1 n.

- Solution d'indicateur : dissoudre 1 g de phénolphaléine dans 100 ml d'éthanol 96 % v/v.

Pour les huiles foncées : dissoudre 2 g de bleu alcalin 68 dans 100 ml d'éthanol 96 % v/v.

Mode opératoire :

1. Dans un vase conique de 250 ml, peser, à 0,01 g près, 5 à 10 g de l'échantillon à examiner.

2. Los het monster op in ongeveer 150 ml van het geneutraliseerde mengsel van ethanol en ether.

Indien de verkregen oplossing niet volkomen helder is, wordt zoveel extra van het mengsel van ethanol en ether toegevoegd tot een heldere oplossing is verkregen.

3. Titreeer de verkregen oplossing al schuddend met de 0,1 n oplossing van kaliumhydroxide in ethanol uit een buret met een schaalverdeling in 0,1 ml tot de kleuromslag van de indicator. De roze kleur van het fenolftaleïne moet gedurende tenminste 10 seconden zichtbaar blijven.

4. Indien de gebruikte hoeveelheid 0,1 n kaliumhydroxide groter is dan 20 ml, wordt de bepaling herhaald onder gebruikmaking van de 0,5 n oplossing van kaliumhydroxide in ethanol.

Berekening

Het zuurgetal is : $\frac{V \times 56,1}{M}$

waarbij :

V = het volume in ml n oplossing van kaliumhydroxide in ethanol, verbruikt bij de titratie

M = de massa in grammen van het ingewogen monster.

Opmerkingen :

Indien de oplossing tijdens de titratie troebel wordt, voegt men een extra hoeveelheid van het mengsel van ethanol en ether toe.

Indien het bij donker gekleurde oliën niet mogelijk is de kleuromslag van het fenolftaleïne duidelijk waar te nemen, kan men alkaliblaauw 6B als indicator gebruiken. Ook in dit geval dient na de kleuromslag van blauw naar rood verkregen kleur tenminste 10 sec. te blijven bestaan.

Bij oliën en vetten, die laurinezuur bevatten dient de temperatuur van het ethanol-ether mengsel tijdens de titratie tussen 15° en 20° C te zijn.

Vrije vetzuren, uitgedrukt als oliezuur

De bepaling wordt uitgevoerd als hiervoor beschreven.

Het gehalte aan vrije vetzuren, uitgedrukt als oliezuur wordt als volgt berekend :

$$\frac{28,2 \times V}{M} \quad \%$$

waarbij V en M dezelfde betekenis hebben als bij de berekening van het zuurgetal.

2. Dissoudre l'échantillon dans 150 ml environ du mélange neutralisé d'éthanol et d'éther.

Si la solution obtenue n'est pas parfaitement limpide, ajouter une quantité supplémentaire du mélange d'éthanol et d'éther jusqu'à obtention d'une solution limpide.

3. Titrer jusqu'au virage de l'indicateur la solution obtenue en l'agitant avec la solution 0,1 n d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol contenue dans une burette graduée en 0,1 ml. La coloration rose de la phénolphtaléine doit persister pendant 10 secondes au moins.

4. Si la quantité utilisée d'hydroxyde de potassium 0,1 n dépasse 20 ml, répéter la détermination en utilisant la solution 0,5 n d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol.

Calcul

l'indice d'acide est : $\frac{V \times 56,1}{M}$,

où :

V = le volume, en ml, de solution n hydroxyde de potassium dans l'éthanol utilisé pour le titrage ,

M = la masse, en g, de l'échantillon mis en oeuvre.

Remarques :

Si la solution se trouble pendant le titrage, ajouter une quantité supplémentaire du mélange d'éthanol et d'éther.

Le bleu alcalin 6B peut être utilisé comme indicateur pour les huiles foncées dont la couleur ne permet pas d'apercevoir nettement le virage de la phénolphtaléine. Dans ce cas aussi, la coloration obtenue après virage de l'indicateur du bleu au rouge doit persister au moins pendant 10 secondes.

Pour les huiles et graisses contenant de l'acide laurique, la température du mélange d'éthanol et d'éther doit se situer entre 15 et 20° C pendant le titrage.

Acides gras libres, exprimés en acide oléique

La détermination s'effectue comme décrit ci-dessus.

La teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique est calculée comme suit :

$$\frac{28,2 \times V}{M} \%$$

où V et M ont la même signification que pour le calcul de l'indice d'acide.

V. Vluchtige stoffen

Onder vluchtige stoffen worden verstaan, water en andere bestanddelen, die worden bepaald door massaverlies, bij verwarming bij 103° C.

1.1. Apparatuur :

- Schaal met platte bodem, 8 à 9 cm diameter, ongeveer 3 cm diep (Petri-schaal)
- Thermometer gegradeerd van 80 tot 110° C, ongeveer 10 cm lang, voorzien van een expansieruimte boven het kwikreservoir
- Zandbak of warmplaat

1.2. Werkwijze :

1. Bepaal het gewicht van een vooraf gedroogde schaal met platte bodem, waarin zich een korte thermometer bevindt.
2. Breng ca. 20 gram van het monster in de schaal en weeg tot op 0,01 gram nauwkeurig.
3. Verwarm de schaal met de inhoud op een zandbad of op een verwarmingsplaat, waarbij de temperatuur met ongeveer 10° C per minuut verhoogd wordt tot een temperatuur van 90° C is bereikt. Roer hierbij voortdurend met de thermometer.
4. Verhoog, onder voortdurend roeren, de temperatuur langzaam tot 103 ± 2° C, let er hierbij op dat geen monstermateriaal door spatten verloren gaat. Overschrijd daarbij de 105° C niet. Blijf roeren door de thermometer over de bodem van de schaal te bewegen tot geen dampbelletjes meer naar boven komen.
5. Om er zeker van te zijn, dat al het water is verwijderd, dient het verwarmingsproces tot 103 ± 2° C enige malen te worden herhaald, waarbij men tussentijds steeds tot 95° C laat afkoelen.
6. Laat vervolgens afkoelen in een exsiccator tot kamertemperatuur en weeg.
7. Herhaal de boven beschreven bewerking totdat het verschil tussen de resultaten van twee opeenvolgende wegingen niet meer bedraagt dan 0,002 gram.

1.3. Berekening :

Het gehalte aan bij 105° C vluchtige stoffen bedraagt :

$$(M_1 - M_2) \times \frac{100}{M_0} \%$$

waarbij :

M_0 = de massa in grammen van het ingewogen monster.

M_1 = de massa in grammen van schaal en inhoud vóór de verwarming.

M_2 = de massa in grammen van schaal en inhoud na de verwarming tot constante massa.

Opmerking

Een vermeerdering van de massa van het monster na herhaald verwarmen wijst op auto-oxydatie van de olie of het vet. In dat geval wordt het resultaat van de weging gebruikt, direct voordat de massa ging toenemen.

V. Matières volatiles

Par matières volatiles, on entend l'eau et autres composants, déterminés par perte de masse, en chauffant à 105° C.

1.1. Appareillage :

- Capsule à fond plat, diamètre de 8 à 9 cm, profondeur d'environ 3 cm (plaque de Pétri)
- Thermomètre gradué de 80 à 110° C, long d'environ 10 cm, muni d'un vase d'expansion au-dessus du réservoir de mercure
- Bain de sable ou plaque chauffante.

1.2. Mode opératoire :

1. Déterminer le poids d'une capsule à fond plat ayant fait l'objet d'une prèdessiccation et où se trouve un thermomètre court.
2. Poser dans la capsule environ 20 g de l'échantillon et peser à 0,01 g près.
3. Chauffer la capsule et son contenu sur un bain de sable ou sur une plaque chauffante, en élevant la température d'environ 10° C par minute jusqu'à 90° C. Agiter constamment avec le thermomètre.
4. Augmenter, en agitant constamment, lentement la température à 103 ± 2° C. Prévenir des projections afin de ne pas perdre une partie de l'échantillon. Ne pas dépasser 105° C. Continuer à agiter en remuant le thermomètre sur le fond de la capsule jusqu'au moment où tout dégagement de bulles a cessé.
5. Pour s'assurer que toute l'eau a été éliminée, répéter plusieurs fois le chauffage à 103 ± 2° C, en le séparant par des refroidissements jusqu'à 95° C.
6. Laisser refroidir dans un exsiccateur jusqu'à la température ambiante et peser.
7. Répéter les opérations ci-dessus jusqu'à ce que la différence entre les résultats de deux pesées successives n'excèdent pas 0,002 g.

1.3. Calcul :

La teneur en matières volatiles à 105° C est égale à :

$$\text{où : } \frac{(M_1 - M_2) \times 100}{M_0} \%$$

M_0 = la masse en grammes, de l'échantillon mis en oeuvre.

M_1 = la masse en grammes, de la capsule et du contenu avant le chauffage.

M_2 = la masse en grammes, de la capsule et du contenu après chauffage jusqu'à masse constante.

Remarque

Une augmentation de la masse de l'échantillon après un chauffage répété indique qu'une auto-oxydation de l'huile ou de la graisse a eu lieu. Dans ce cas, prendre comme résultat la pesée effectuée immédiatement avant que la masse ne commence à augmenter.

VI. Identificatie van olijfolie verkregen uit eerste persing

1. Specifieke extinctiecoëfficiënt bij 270 nm (K_{270})

De specifieke extinctiecoëfficiënt van olijfolie bij 270 nm (K_{270}) is de extinctie van een oplossing van 1 gram olie in 100 ml 2.2.4.-trimethylpentaan gemeten bij 270 nm in een 1 cm cuvet $[E_{1cm}^{1\%} (270 \text{ nm})]$.

1.1. Apparatuur en reagentia

- Spectrofotometer
- Kwartscuvetten, optische weglengte 10 mm
- 2.2.4.-trimethylpentaan (iso-octaan) analytisch zuiver.
De transmissie in procenten moet ten minste 98 % bedragen gemeten bij 270 nm ten opzichte van water als referentie.
- Maatkolven van 100 ml
- Analytische balans.

1.2. Werkwijze

1. Weeg 1 gram olie tot op 1 mg nauwkeurig af en breng dit met iso-octaan kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml.
2. Vul met iso-octaan tot de merkstreep aan en meng.
3. Breng een deel van de meetoplossing (1.2.) over in een kwartscuvel met een optische weglengte van 1 cm en meet de absorptie van de meetoplossing bij 270 nm tegen iso-octaan als referentie (K_{270}).

2. Specifieke extinctiecoëfficiënt van olijfolie bij 270 nm na behandeling met gedesactiveerd aluminiumoxyde

De definitie van de specifieke extinctiecoëfficiënt evenals de meting hiervan zijn identiek aan die beschreven onder 1. Vóór de meting wordt de olijfolie echter behandeld met basisch aluminiumoxyde.

2.1. Behandeling met gedesactiveerd aluminiumoxyde

1. Verhit basisch aluminiumoxyde voorzien van de kwaliteitsaanduiding voor chromatografie en met een korrelgrootte tussen 30 en 130 μm (gemiddelde korrelgrootte 80 μm) in een porceleinen schaal gedurende 3 uur bij 380 tot 400° C. Stel de activiteit van het aluminiumoxyde zoals voor het onderzoek vereist, in door aan 100 gram 5 ml water toe te voegen en meerdere malen goed te mengen. Bewaar het mengsel gedurende één nacht in een hermetisch gesloten vat ; het aluminiumoxyde is nu voor gebruik gereed.

VI. Identification de l'huile d'olive vierge

1. Coefficient d'extinction spécifique à 270 nm (K_{270})

Le coefficient d'extinction spécifique de l'huile d'olive à 270 nm (K_{270}) est l'extinction d'une solution de 1 gramme d'huile dans 100 ml de 2,2,4.-triméthylpentane, mesurée à 270 nm dans une cuvette de 1 cm [$E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (270 nm)].

1.1. Appareillage et réactifs :

- Spectrophotomètre.
- Cuvettes de quartz, chemin optique 10 mm.
- 2,2,4.-triméthylpentane (iso-octane) analytiquement pur.
La transmission en pour-cent, mesurée à 270 nm par rapport à l'eau prise comme référence, doit être d'au moins 98 %.
- ballons jaugés de 100 ml.
- Balance analytique.

1.2. Mode opératoire :

1. Peser 1 gramme d'huile à 1 mg près et le transférer quantitativement avec de l'iso-octane dans un ballon jaugé de 100 ml.
2. Compléter jusqu'au trait à l'aide d'iso-octane et mélanger.
3. Transférer une partie de la solution à mesurer (1.2.) dans une cuvette de quartz à chemin optique de 1 cm et mesurer l'absorption de la solution à 270 nm contre l'iso-octane comme référence (K_{270}).

2. Coefficient d'extinction spécifique de l'huile d'olive à 270 nm après traitement à l'oxyde d'aluminium désactivé

La définition du coefficient d'extinction spécifique de même que sa mesure sont identiques à celles décrites sous 1. Toutefois, avant la mesure, l'huile d'olive est traitée à l'oxyde d'aluminium basique.

2.1. Traitement à l'oxyde d'aluminium désactivé :

1. Dans une cuvette de porcelaine, chauffer pendant 3 heures à 380-400° C, de l'oxyde d'aluminium basique portant la mention de qualité pour chromatographie dont les granules ont une dimension entre 30 et 130 μm (dimension moyenne 80 μm). Ajuster l'activité de l'oxyde d'aluminium requise pour la recherche, en ajoutant 5 ml d'eau à 100 grammes et en mélangeant soigneusement à plusieurs reprises. Conserver le mélange pendant une nuit dans un récipient hermétiquement fermé ; l'oxyde d'aluminium est ainsi prêt à l'emploi.

2. Controleer de activiteit van het onder 2.1.1. verkregen aluminiumoxyde als volgt.

Breng 30 gram aluminiumoxyde verkregen onder 2.1.1. in een chromatografiekolom met een inwendige doorsnede van 35 mm, lang 450 mm en voorzien van een afvoerbuis met een inwendige doorsnede van ongeveer 10 mm. Tik voorzichtig met de onderkant van de kolom zo lang tegen een houten oppervlak tot de kolomvulling niet verder inzakt. Maak een mengsel van 95 % olijfolie van eerste persing (maagdelijke olijfolie) met een specifieke extinctiecoëfficiënt van kleiner dan 0,18 en 5 % arachide-olie behandeld met bleekarde en waarvan de specifieke extinctiecoëfficiënt ten minste 4 bedraagt (1.). Los 10 gram van dit mengsel op in 100 ml n-hexaan en elueer over de kolom. Vang het eluaat op in een passende kolf en verdamp het oplosmiddel onder vacuum bij een temperatuur niet hoger dan 25° C. Bepaal op de wijze aangegeven onder 1. de specifieke extinctiecoëfficiënt van het residu. Deze moet ten minst 0,11 bedragen. Indien niet hieraan is voldaan - de geconjugeerde triënen zijn niet geëluëerd - moet een meer gedesactiveerd aluminiumoxyde worden bereid (meer water toevoegen onder 2.1.1.) en opnieuw op de hierboven beschreven wijze de activiteit worden gecontroleerd.

3. Breng 30 gram van het onder 2.1.1. verkregen gedesactiveerde basisch aluminiumoxyde in een kolom zoals beschreven onder 2.1.2. en vul deze op de eveneens daar aangegeven wijze. Maak een oplossing van 10 gram van de te onderzoeken olie in 100 ml n-hexaan en elueer deze over de kolom. Damp het oplosmiddel af als aangegeven onder 2.1.2. en bepaal de specifieke extinctiecoëfficiënt van het residu bij 270 nm als aangegeven onder 1.2.

3. Bepaling van de variatie van de specifieke extinctiecoëfficiënt (ΔK)

De variatie van de specifieke extinctiecoëfficiënt ΔK wordt als volgt gedefinieerd :

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

waarin :

K_m = de specifieke extinctiecoëfficiënt gemeten bij het maximum van absorptie bij ongeveer 270 nm.

K_{m+4} en K_{m-4} = de specifieke extinctiecoëfficiënten gemeten bij golflengten die ten opzichte van de golflengte van het absorptie-maximum 4 nm naar boven en beneden zijn verschoven.

OPMERKING : Indien het spectrum geen maximum vertoont in de buurt van 270 nm worden de extinctiecoëfficiënten gemeten bij 270, 266 en 274 nm.

2. Contrôler comme suit l'activité de l'oxyde d'aluminium obtenu selon 2.1.1.

Déposer 30 grammes d'oxyde d'aluminium obtenu selon 2.1.1. dans une colonne pour chromatographie ayant un diamètre intérieur de 35 mm et une longueur de 450 mm et dotée d'un tube d'évacuation dont le diamètre intérieur est d'environ 10 mm. Tapoter prudemment la partie inférieure de la colonne contre une surface de bois jusqu'à ce que le niveau du contenu de la colonne ne s'abaisse plus. Confectionner un mélange de 95 % d'huile d'olive vierge ayant un coefficient d'extinction spécifique inférieur à 0,18 et de 5 % d'huile d'arachide traitée à l'argile smectique dont le coefficient d'extinction spécifique est d'au moins 4 (1.). Dissoudre 10 grammes de ce mélange dans 100 ml d'hexane n et éluer sur la colonne. Recueillir l'éluat dans un ballon approprié et évaporer le solvant sous vide à une température ne dépassant pas 25° C. Déterminer le coefficient d'extinction spécifique du résidu de la façon énoncée sous 1. Ce coefficient doit être d'au moins 0,11. Si cette condition n'est pas remplie - les triènes conjugués ne sont pas élués - il faut préparer un oxyde d'aluminium plus désactivé (ajouter davantage d'eau sous 2.1.1.) et contrôler à nouveau l'activité de la façon décrite ci-dessus.

3. Déposer 30 grammes de l'oxyde d'aluminium basique désactivé obtenu selon 2.1.1., dans une colonne décrite sous 2.1.2. et la remplir de la manière qui y est également décrite. Confectionner une solution de 10 grammes de l'huile à examiner dans 100 ml d'hexane n et l'éluer sur la colonne. Evaporer le solvant selon 2.1.2. et déterminer le coefficient d'extinction spécifique du résidu à 270 nm selon 1.2.

3. Détermination de la variation du coefficient d'extinction spécifique (ΔK)

La variation du coefficient d'extinction spécifique ΔK est définie comme suit :

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

où

K_m = le coefficient d'extinction spécifique mesuré au maximum d'absorption à environ 270 nm.

K_{m+4} et K_{m-4} = les coefficients d'extinction spécifique mesurés à des longueurs d'ondes déplacées de 4 nm au-dessus et en dessous de la longueur d'onde du maximum d'absorption.

REMARQUE :

Si le spectre ne présente pas de maximum aux abords de 270 nm, les coefficients d'extinction sont mesurés à 270, 266 et 274 nm.

3.1. Werkwijze

1. Meet het UV-spectrum van de onder 1.2.1. verkregen oplossing en bepaal de specifieke extinctiecoëfficiënten K_m , K_{m+4} en K_{m-4} .
2. Indien de absorptiecurve geen maximum vertoont moet worden gehandeld als hiervoren aangegeven onder OPMERKING.

VII. Aantonen van residu-olie in olijfolie

1. Bellier-reactie

1.1. Apparatuur en reagentia

- Maatkolven van 100 en 500 ml
- Terugvloeikoeler
- Maatpipet van 5 ml met schaalverdeling in 0,1 ml
- Thermometer met een schaal van 15 tot 60° C
- Kaliumhydroxyde-oplossing. Los 42,5 gram kaliumhydroxyde op in 72 ml gedestilleerd water, vul in een 500 ml maatkolf tot de maatstreep aan met ethanol 96 % (v/v) en meng.
- Ethanol 70 % (v/v).
- Azijnzuuroplossing. Meng 1 volumedeel azijnzuur met 2 volumedelen water. Titreer 1,5 ml van de oplossing met de hierboven genoemde kaliumhydroxyde-oplossing ; indicator fenolftaleïne. Het verbruik aan kaliumhydroxyde-oplossing moet precies 5 ml bedragen. Is dit niet het geval dan moet de azijnzuuroplossing met azijnzuur of water op deze waarde worden ingesteld.

1.2. Voorbereiding van het monster

Verwarm, indien nodig, de olie voorzichtig tot alle vastgeworden bestanddelen vloeibaar zijn en filtreer door een vouwfilter ter verwijdering van aanwezig water.

1.3. Werkwijze

1. Pipetteer 1 ml monster in een 100 ml kolf en voeg 5 ml kaliumhydroxyde-oplossing toe.
2. Plaats een terugvloeikoler op de kolf en kook de inhoud gedurende 10 minuten onder terugvloeiing. Meng de inhoud af en toe door schudden.
3. Koel af tot kamertemperatuur en voeg 1,5 ml azijnzuuroplossing evenals 50 ml van de tot 50° C verwarmde ethanol 70 % (v/v) toe.
4. Meng zorgvuldig, plaats de thermometer in de oplossing en laat afkoelen. Bekijk de oplossing zodra deze de temperatuur van 45° C heeft bereikt. Indien zich gedurende de afkoeling van de oplossing over het temperatuurtraject van 45 tot 40° C een vlokkig neerslag vormt is de reactie op residu-olie positief.

OPMERKING ; Wanneer een niet-vlokkig neerslag ontstaat moet de oplossing (1.3.4.) gedurende tenminste 24 uur en zo nodig gedurende 48 uur bewaard bij 20 tot 22° C. Ontstaat alsnog een vlokkig neerslag dan is de reactie eveneens positief.

3.1. Mode opératoire

1. Mesurer le spectre UV de la solution obtenue selon 1.2.1. et déterminer les coefficients d'extinction spécifiques K_m , K_{m+4} et K_{m-4}
2. Si la courbe d'absorption ne présente pas de maximum, il faut opérer comme indiqué sous REMARQUE ci-dessus.

VII. Détection de l'huile résiduaire dans l'huile d'olive

1. Réaction Bellier

1.1. Appareillage et réactifs

- Ballons jaugés de 100 et 500 ml
- Réfrigérant à reflux
- Pipette calibrée de 5 ml avec étalonnage en 0,1 ml
- Thermomètre échelonné de 15 à 60° C
- Solution d'hydroxyde de potassium. Dissoudre 42,5 grammes d'hydroxyde de potassium dans 72 ml d'eau distillée, compléter jusqu'au trait dans un ballon jaugé de 500 ml à l'aide d'éthanol 96 % (v/v) et mélanger.
- Ethanol 70 % (v/v).
- Solution d'acide acétique. Mélanger un volume d'acide acétique et 2 volumes d'eau. Titrer 1,5 ml de la solution à l'aide de la solution d'hydroxyde de potassium précitée ; indicateur: phénolphthaléine L'utilisation de solution d'hydroxyde de potassium doit être exactement de 5 ml. Dans la négative, il faut ajuster la solution d'acide acétique à cette valeur à l'aide d'acide acétique ou d'eau.

1.2. Préparation de l'échantillon

Au besoin, chauffer prudemment l'huile jusqu'à liquéfaction de tous les composants solidifiés et filtrer sur un filtre plissé pour éliminer l'eau présente.

1.3. Mode opératoire

1. Pipeter 1 ml de l'échantillon dans un ballon de 100 ml et ajouter 5 ml de solution d'hydroxyde de potassium.
2. Placer un réfrigérant à reflux sur le ballon et faire bouillir le contenu pendant 10 minutes sous reflux. Mélanger le contenu de temps à autre en l'agitant.
3. Refroidir à la température ambiante et ajouter 1,5 ml de solution d'acide acétique ainsi que 50 ml d'éthanol 70 % (v/v) chauffé à 50° C.
4. Mélanger soigneusement, placer le thermomètre dans la solution et laisser refroidir. Examiner la solution dès que sa température est descendue à 45° C. La réaction à l'huile résiduaire est positive si, au cours du refroidissement de la solution, un précipité floconneux se forme pendant le passage de la température de 45 à 40° C.

REMARQUE : S'il se forme un précipité non floconneux, il faut conserver la solution (1.3.4.) pendant au moins 24 heures et au besoin pendant 48 heures à 20 à 22° C. Si un précipité floconneux se forme à ce moment, la réaction est seulement positive.

VIII. Onderzoek van olijfolie op aanwezigheid van andere oliën
analyse van de sterolfraction van vetten en oliën

1. Beginsel

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

2. Toestellen

1. apparatuur voor dunnelaagchromatografie, met name bestaande uit vier glasplaten van 20 x 20 x 0,4 cm en 2 van 20 x 5 x 0,4 cm en een microsput van 0,1 ml :

2. bekeerglas van 50 ml

3. filterkroezen met poreusheid 3, doorsnede 15 mm

4. kolf van 100 ml

5. centrifugebuisje 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. Microsput waarmee hoeveelheden tot 5 of 10 μ l kunnen worden geïnjecteerd.

3. 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

(1) Bij voorbeeld SE 30.

VIII. Recherche de la présence d'autres huiles dans l'huile d'olive :
analyse de la fraction stérolique des corps gras

1. Principe

Analyse par chromatographie en phase gazeuse des stérols séparés par chromatographie sur couche mince à partir de l'insanonifiable séché avec précaution.

2. Appareillage

1. appareillage pour la chromatographie sur couche mince, comprenant en particulier quatre plaques de verre de 20 x 20 x 0,4 cm, deux de 20 x 5 x 0,4 cm et une microseringue de 0,1 ml
2. béccher de 50 ml
3. filtres poreux, porosité 3, diamètre 15 mm
4. ballon de 100 ml
5. éprouvette de centrifugeuse à fond conique de 10 ml, munie d'un bouchon rodé
6. pipettes graduées de 1 ml
7. appareil de chromatographie en phase gazeuse, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme avec un injecteur en argent ou en verre ou système d'injection directe sur la colonne et relié à un enregistreur
8. colonne de chromatographie en phase gazeuse, en verre ou en acier inoxydable en U ou spirale, de 1 à 2 m de long et de 3 à 4 mm de diamètre intérieur; phase stationnaire de gomme de silicone (type méthyl (1)) stable jusqu'à au moins 300°C, imprégnant au taux de 2 à 4 % une terre de diatomée calcinée, lavée aux acides et silanisée, de granulométrie 80/100 ou 100/120 mesh.

Remarque : certains types d'acier inoxydable pouvant provoquer des résultats erronés par détérioration des stérols, le verre est recommandé

9. microseringue pouvant fournir des volumes atteignant 5 ou 10 μ l.

3. Réactifs

1. chloroforme pour chromatographie
2. benzène pour chromatographie
3. heptane
4. gel de silice (par exemple Kieselgel G)
5. Solution de référence pour la chromatographie sur plaque constituée de cholestérol à 5 % dans le chloroforme

(1) Par exemple SE 30.

6. aceton voor chromatografie
 7. Natriumzout van 2'7'-dichloorfluoresceïne, 0,1 % oplossing in absolute ethanol
 8. pyridine
 9. hexamethyldisilazaan
 10. trimethylchloorsilaan
 11. oplossing voor de gevoeligheidstest : 1 mg cholesterol in ml n-pentaaan
 12. oplossing voor de bepaling van het scheidend vermogen : 0,9 mg fyto-sterolen van reapolie en 0,1 mg cholesterol in ml n-pentaaan. 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-pentaaan, vers bereid zoals omschreven in punt B van de werkwijze.
4. Bereiding van de platen voor dunnelaagchromatografie

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

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 gasen door gedurende ten minste 1 minuut de kolf onder vacuüm te brengen met behulp van een wateretraalluchtpomp. 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.

5. Werkwijze

5.1. Bereiding van de onverzeepbare rest

Inleiding

Onder de onverzeepbare rest worden verstaan de stoffen, die oplosbaar zijn in vetten en die na verzeeping 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.

6. acétone pour chromatographie
 7. solution à 0,1 % dans l'alcool éthylique absolu de sel sodique de 2'7' dichlorofluorescéine
 8. pyridine
 9. hexaméthylsilazane
 10. triméthyl chlorosilane
 11. solution pour le test de sensibilité : 1 mg de cholestérol par ml de n-pentane
 12. solution pour le test de la résolution des pics : 0,9 mg de phytostérols d'huile de colza et 0,1 mg de cholestérol par ml de n-pentane. Les stérols doivent être fraîchement préparés selon le procédé décrit sous B du mode opératoire
 13. solution pour le test de référence : 1 mg de phytostérols d'huile de tourneol par ml de n-pentane, fraîchement préparés comme cela est décrit sous B du mode opératoire.
4. Préparation des plaques pour chromatographie

Placer dans l'ordre, sur l'étaleur, une plaque 20 x 5 x 0,4 cm, quatre plaques 20 x 20 x 0,4 cm et une plaque 20 x 5 x 0,4 cm.

Dans un ballon de 500 ml à col large, placer 40 g de gel de silice et environ 80 ml d'eau. Agiter avec une baguette en verre, éventuellement avec un agitateur mécanique en verre jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Eliminer les gaz éventuels en faisant le vide à l'aide d'une trompe à eau pendant une minute au moins. Porter ensuite la suspension sur l'étaleur tout en réglant l'épaisseur à 0,5 mm et recouvrir uniformément les plaques. Laisser sécher les plaques à l'air pendant quinze minutes environ et sécher ensuite dans une étuve à 105° C pendant deux heures. Conserver les plaques ainsi préparées dans un dessiccateur sous vide.

5. Mode opératoire

5.1. Préparation du l'insaponifiable

Introduction

On désigne sous le nom d'insaponifiable les substances solubles dans la matière grasse, lesquelles, après saponification, sont insolubles dans l'eau et solubles dans le solvant utilisé pour le dosage. Il comprend les constituants naturels des matières grasses (stérols, alcools, hydrocarbures), ainsi que les substances organiques non volatiles à 100° C (huiles minérales) étrangères aux matières grasses qu'elles peuvent éventuellement contenir. Comme solvant, on utilise l'éther de pétrole ou bien l'oxyde d'éthyle. Il faut tenir compte que les résultats avec les deux solvants sont, dans la plupart des cas, différents et qu'on trouve des teneurs en % plus élevées avec l'oxyde d'éthyle. Pour l'huile d'olive, compte tenu des conditions climatiques où se trouvent la majorité des laboratoires d'analyses, l'éther de pétrole a été reconnu comme le solvant à employer.

5.2. Methode met petroleumether

Toestellen

- kolf van ongeveer 150 ml voorzien van een terugvloeiakoeler
- scheidrechters 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 terugvloeiakoeler 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 scheidrecther 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 scheidrecther. 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 scheidrecther 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.

5.2. Méthode à l'éther de pétrole

Matériel

- ballon d'environ 150 ml pouvant être adapté à un réfrigérant à reflux
- ampoules à décantier d'environ 500 ml
- étuve réglée à $103^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$.

Réactifs

- solution éthanolique de KOH environ 2 N dans l'éthanol à 95 % (v/v).
Le réactif ne devra pas être plus foncé que la couleur jaune paille
- éther de pétrole distillant entre 40 et 60°C , possédant un indice de brome inférieur à 1, exempt de résidu.

Mode opératoire

Peser exactement à 0,01 g près environ 5 g de matière grasse dans le ballon. Ajouter 50 ml de la solution éthanolique de KOH environ 2 N. Adapter au réfrigérant à reflux. Chauffer une heure à légère ébullition. Arrêter le chauffage. Ajouter par le haut du réfrigérant environ 50 ml d'eau distillée et agiter.

Transvaser après refroidissement dans une ampoule à décantier et rincer le ballon à plusieurs reprises, avec au total environ 50 ml d'éther de pétrole.

Agiter énergiquement pendant une minute.

Laisser reposer jusqu'à séparation complète des deux phases et recueillir la solution savonneuse dans une seconde ampoule à décantation. S'il se forme, par exception, une émulsion, la détruire par addition de petites quantités d'éthanol ou de solution concentrée d'hydroxyde de potassium.

Répéter l'extraction de la solution savonneuse encore deux fois avec chaque fois environ 50 ml d'éther de pétrole.

Réunir les 3 fractions éthérées dans une même ampoule, les laver à trois reprises avec environ 50 ml d'éthanol à 50 % (v/v).

Par le haut de l'ampoule, transvaser, en plusieurs fois si nécessaire, quantitativement la solution d'éther de pétrole dans un ballon de 250 ml taré (en effectuant des petits rinçages de l'ampoule avec de l'éther de pétrole).

Le solvant est éliminé en le chauffant prudemment sous vide, les résidus sont séchés à une température inférieure à 50°C sous vide, en vue d'éviter des oxydations indésirables.

5.3. Scheiding van de sterolfraction met behulp van dunne laagchromatografie

Breng in de ontwikkelingskamer een mengsel van n-heptaan/acetone - 85/15 (v/v) of van benzene/acetone 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 filterpapier aan te brengen, die in de elutievluchtstof 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 onverzeepte rest in chloroform. Breng ongeveer 0,3 ml van deze oplossing met behulp van de microsprit 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 μ l van de vergelijkingsoplossing met cholesterol op ter bepaling van de Rf-waarde van de sterolen.

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

Mak 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 bekersglas 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 sterolfraction.

5.4. Gaschromatografische bepaling van sterolen

1. Bereiding van de trimethylsilylethers (TMS)

Voor elke mg sterolen dient aan het centrifugebuisje 0,02 ml silaneringsreagens te worden toegevoegd, bestaande uit een mengsel van pyridine-hexamethylsililazaan-trimethylchlorosilane 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.

5.3. Séparation de la fraction stérolique par chromatographie sur couche mince

Introduire dans la cuve de développement le mélange heptane n-acétone 85/15 ou benzène/acétone 95/5 (v/v) jusqu'à hauteur d'1 cm environ ; fermer à l'aide du couvercle et laisser reposer pendant trois heures au moins de façon que l'équilibre liquide/vapeur s'établisse. Il est également conseillé de fixer sur les surfaces intérieures de la chambre des bandes de papier filtre qui plongent dans l'éluant. Cette précaution offre l'avantage de réduire d'un tiers environ la durée de migration du front du liquide et de faire éluer les composants de façon plus uniforme.

Préparer entre-temps une solution à 5 % d'insaponifiable extrait à l'éther de pétrole dans le chloroforme. Déposer 0,3 ml environ de cette solution à l'aide de la microseringue de 0,1 ml sur la plaque chromatographique à 1,5 cm environ du bord inférieur, en bande continue et uniforme de façon à obtenir une ligne de départ la plus mince possible. Selon la technique habituelle, déposer à une extrémité de la plaque quelques ml de la solution de référence contenant du cholestérol afin d'identifier le Rf de la fraction stérolique.

Placer la plaque dans la cuve de développement préparée comme indiqué ci-dessus. La température ambiante doit être de 20° C environ. Fermer avec le couvercle et développer jusqu'à ce que le front du solvant soit arrivé à 1 cm environ du bord supérieur de la plaque. Retirer la plaque de la chambre de développement et laisser évaporer le solvant dans un courant d'azote chaud.

Révéler en vaporisant uniformément et avec précaution la solution alcoolique de sel sodique de la 2'7' dichlorofluorescéine sur la plaque. En examinant la plaque à l'ultraviolet, on détermine la position des stérols grâce à l'alignement avec la tache de cholestérol provenant de la solution de référence. Récupérer en grattant à l'aide d'une spatule métallique la bande des stérols. Introduire le gel de silice détaché dans un bécher de 50 ml avec 15 ml de chloroforme chaud, agiter et transférer la totalité de gel de silice sur le creuset filtrant et filtrer.

Laver trois fois le filtre chaque fois avec une portion de 15 ml de chloroforme chaud, tout en recueillant le filtrat dans un ballon de 100 ml.

Évaporer la solution chloroformique jusqu'à 4 à 5 ml et la verser dans le tube à centrifuger muni d'un bouchon rodé, taré au préalable. Sécher en évaporant le solvant par un léger réchauffement dans un courant d'azote et peser la fraction stérolique ainsi obtenue.

5.4. Analyse chromatographique en phase gazeuse des stérols

1. Préparation des triméthylsilyléthers (TMSE).

Pour chaque mg de stérol, ajouter dans l'éprouvette 0,02 ml de réactif pour la silanisation, composé d'un mélange de pyridine-hexaméthylsilazane-triméthylchlorosilane 9/3/1 (v/v/v) en ayant soin d'éviter toute trace d'humidité. Placer l'éprouvette dans un dessiccateur pendant trente minutes environ, puis fermer, centrifuger pendant quelques minutes. Prélever, pour l'analyse à pratiquer ensuite, la solution restante.

2. Omatandigheden 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 omatandigheden 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 verzwakken in. Als de basaalijn 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 μ l van de aldus bereide oplossing (TMS). In het chromatogram mag alléén 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 μ l van de aldus bereide oplossing (TMS).

De cholesterol-, brassicasterol-, campesterol en β -sitosterolpieken moeten in het chromatogram verschijnen. Meet de retentieafstanden (afstand van het injectieerpunt 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 basaalijn 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 retentietijden (cholesterol = 1,00) voor brassicasterol, campesterol en β -sitosterol.

2. Conditions de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse

Température de la colonne : 220 à 250° C.

Température du système d'injection s'il est chauffé séparément : 20 à 40° C au-dessus de la température de la colonne. Débit de l'azote : 30 à 60 ml par minute. Déconnecter le détecteur et équilibrer les nouvelles colonnes dans ces conditions pendant seize à vingt-quatre heures. Connecter le détecteur, allumer la flamme et régler les débits d'hydrogène, d'oxygène ou d'air de façon à obtenir une hauteur de flamme et une sensibilité convenables. Mettre en marche l'enregistreur et laisser se dérouler le papier à une vitesse appropriée ; ajuster le zéro et l'atténuateur. Si la ligne de base est stable, l'appareil est prêt à être utilisé.

3. Test de sensibilité

Prélever 5 ml de la solution du test de sensibilité, évaporer le solvant, traiter comme indiqué en 1 ; injecter 0,1 à 0,2 μ l de la solution ainsi préparée (TMSE). Un pic de cholestérol doit seul apparaître sur le chromatogramme.

Régler l'atténuateur de façon à utiliser approximativement toute l'échelle de l'enregistreur.

4. Test de résolution des pics

Prélever 5 ml de la solution préparée pour le test de résolution.

Evaporer le solvant, traiter comme indiqué en 1.

Injecter 0,1 à 0,2 μ l de la solution ainsi préparée (TMSE)

Les pics de cholestérol, de brassicastérol, de campestérol et de β -sitostérol doivent apparaître sur le chromatogramme. Mesurer les distances de rétention (distance du point d'injection au point de hauteur maximal du pic) des pics, d_{CH} pour le cholestérol, d_B pour le brassicastérol, d_C pour le campestérol et d_S pour le β -sitostérol et les largeurs à la base des pics (longueur de rétention entre les intersections avec la ligne de base des tangentes aux points d'inflexion situés sur les côtés avant et arrière du pic) ω_{CH} pour le cholestérol et ω_B pour le brassicastérol. La résolution des pics, exprimée par la formule

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

doit être égale au moins à 1.

Calculer les temps de rétention relatifs (cholestérol = 1,00) pour le brassicastérol, le campestérol et le β -sitostérol.

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 μ l van de aldus bereide oplossing (TMS). De pieken van campesterol, stigmasterol, β -sitosterol en Δ 7-stigmastenol moeten in het chromatogram verschijnen. Meest de retentieafstanden van de pieken : d_{ST} voor campesterol, d_{ST} voor stigmasterol, d_S voor β -sitosterol en d_{ST}^c 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 μ l van de TMS-oplossing van de te bepalen sterolen en neem het chromatogram.

5.5. Weergave van de resultaten

1. Voor een interpretatie van de samenstelling van de onderzochte sterolfractie mogen geen pieken met een andere retentietijd 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 :

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

2. Betrokken op de totale sterolsamenstelling in % :

- a) mag het gehalte aan β -sitosterol niet lager zijn dan 93 % ;
- b) mag het gehalte aan cholesterol en Δ 7-stigmastenol niet hoger zijn dan 0,5 % voor elk van deze bestanddelen ;
- c) mag het gehalte aan campesterol niet hoger zijn dan 4 % ;
- d) moet het gehalte aan stigmasterol lager zijn dan het gehalte aan campesterol.

- (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.

5. Test de référence

Prélever 5 ml de la solution du test de référence, évaporer le solvant, traiter comme indiqué en 1, injecter 0,1 à 0,2 μ l de la solution ainsi préparée (TMSE). Les pics de campestérol, de stigmastérol, de β -sitostérol et Δ^7 stigmastérol doivent apparaître sur le chromatogramme.

Mesurer les distances de rétention des pics, d_c pour le campestérol, d_{ST} pour le stigmastérol, d_s pour le β -sitostérol et $d_{ST} - 7$ pour le Δ^7 stigmastérol.

Calculer les temps de rétention relatifs qui sont approximativement :

cholestérol :	1,0
brassicastérol :	1,1
campestérol :	1,3
stigmastérol :	1,4
β -sitostérol :	1,6 (1)
Δ^7 stigmastérol :	1,8 (2)

6. Analyse

Injecter 0,1 à 0,2 μ l de la solution TMSE des stérols à analyser et enregistrer le chromatogramme.

5.5. Expression des résultats

- Pour l'interprétation de la composition de la fraction stérolique analysée, il ne faut pas relever des pics ayant des temps de rétention différents de ceux déterminés expérimentalement pour les 6 stérols susmentionnés.

La teneur en % en β -sitostérol est donnée par la formule :

$$\frac{\text{Aire du pic du } \beta\text{-sitostérol}}{\text{Somme des aires des six pics de stérols}} \times 100$$

- Par rapport à la composition en % des stérols totaux, le contenu :

- en β -sitostérol ne devra pas être inférieur à 93 % ;
- en cholestérol et en Δ^7 stigmastérol ne devra pas être supérieur à 0,5 % pour chacun de ces composants ;
- en campestérol ne devra pas être supérieur à 4 % ;
- en stigmastérol devra être inférieur au campestérol.

- Si d'autres stérols ont, comme le Δ^5 avenastérol, dans ces conditions, le même volume de rétention que le β -sitostérol, ils sont comptés comme du β -sitostérol.
- Si d'autres stérols ont, dans ces conditions, le même volume de rétention que le Δ^7 stigmastérol, ils sont comptés comme du Δ^7 stigmastérol.

BENELUX TIJDSCHRIFT

In dit tijdschrift worden artikelen gepubliceerd over actuele onderwerpen betreffende de Benelux-samenwerking, alsmede economische en sociale overzichten uit de drie landen.

In een bijlage worden statistische tabellen opgenomen.

De prijs voor een jaarabonnement op dit tweetalig tijdschrift — Nederlands-Frans — bedraagt F 250,— of f 17,25 (per nummer F 80,— of f 5,50).

Voor de verkoopadressen raadplegen men de achterzijde van deze omslag.

REVUE BENELUX

Ce Bulletin trimestriel publie des articles traitant de l'actualité de la coopération Benelux ainsi que de sujets économiques et sociaux relatifs aux trois pays

Une annexe à ce Bulletin publie des tableaux statistiques.

Le prix de l'abonnement annuel à ce bulletin bilingue — français et néerlandais — s'élève à F 250,— (le numéro F 80,—).

Pour les adresses des bureaux de vente, prière de consulter le dos de la présente couverture.

NIET-PERIODIEKE PUBLIKATIES VAN HET SECRETARIAAT-GENERAAL

Het Sekretariaat-Generaal geeft ook niet-periodieke publikaties uit o.m. op sociaal, financieel en statistisch gebied. De volledige lijst van de niet-periodieke publikaties is verkrijgbaar op het Secretariaat-Generaal van de Benelux Economische Unie, Regenschapsstraat 39, 1000 Brussel.

PUBLICATIONS NON PERIODIQUES DU SECRETARIAT GENERAL

Le Secrétariat général édite également des publications non périodiques traitant notamment de questions sociales, financières et statistiques. La liste complète de ces publications peut être obtenue au Secrétariat général de l'Union économique Benelux, 39, rue de la Régence, 1000 Bruxelles.

PRIJZEN

Het Benelux-Publikatieblad kost F 1,—
(± 6,9 cent) per bedrukte bladzijde.

Facturering van abonnementen ge-
schiedt per trimester.

Dit nummer kost f 2,75 of F 40,—.

De volledige verzameling der Benelux-
Basisteksten (t/m de 106° aanvulling,
losbladig, in 10 plastic banden) kost
f 443,05 of F. 6.424,—.

PRIX

Le Bulletin Benelux coûte F 1,— la
page imprimée.

Les abonnements sont facturés par
trimestre.

Le présent numéro coûte F 40,—.

La collection complète des Textes de
base Benelux (y compris le 106° sup-
plément, sur feuillets mobiles, 10 re-
liures en plastic) coûte F 6.424,—.

KANTOREN voor VERKOOP en ABONNEMENTEN :

België

BELGISCH STAATSBLAD

Leuvenseweg 40, 1000 Brussel
Uitsluitend door overschrijving van
het verschuldigde bedrag op PCR
000-2005502-27 van het Bestuur van het
Belgisch Staatsblad te Brussel.

Nederland, Luxemburg en derde landen

STAATSUITGEVERIJ

Chr. Plantijnstraat, 's-Gravenhage.
Gironr. 425.300.

BUREAUX de VENTE et d'ABONNEMENTS :

Belgique

MONITEUR BELGE

40, rue de Louvain, 1000 Bruxelles.
Exclusivement par virement au CCP
000-2005502-27 de la Direction du
Moniteur belge à Bruxelles.

Pays-Bas, Luxembourg et pays tiers

STAATSUITGEVERIJ

Chr. Plantijnstraat, La Haye (Pays-
Bas) Giro n° 425.300.