

Το παρόν έγγραφο αποτελεί απλώς βοήθημα τεκμηρίωσης και τα θεσμικά όργανα δεν αναλαμβάνουν καμία ευθύνη για το περιεχόμενό του

► **B****ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

της 11ης Ιουλίου 1991

σχετικά με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων καθώς και με τις μεθόδους προσδιορισμού

(ΕΕ L 248 της 5.9.1991, σ. 1)

Τροποποιείται από:

		Επίσημη Εφημερίδα		
		αριθ.	σελίδα	ημερομηνία
► <u>M1</u>	Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 3682/91 της Επιτροπής της 17ης Δεκεμβρίου 1991	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u>	Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1429/92 της Επιτροπής της 26ης Μαΐου 1992	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u>	Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1683/92 της Επιτροπής της 29ης Ιουνίου 1992	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u>	Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1996/92 της Επιτροπής της 15ης Ιουλίου 1992	L 199	18	18.7.1992
► <u>M5</u>	Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 3288/92 της Επιτροπής της 12ης Νοεμβρίου 1992	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u>	Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 183/93 της Επιτροπής της 29ης Ιανουαρίου 1993	L 22	58	30.1.1993
► <u>M7</u>	τροποποιήθηκε με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 826/93 της Επιτροπής της 6ης Απριλίου 1993	L 87	6	7.4.1993
► <u>M8</u>	Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 620/93 της Επιτροπής της 17ης Μαρτίου 1993	L 66	29	18.3.1993
► <u>M9</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 177/94 της Επιτροπής της 28ης Ιανουαρίου 1994	L 24	33	29.1.1994
► <u>M10</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2632/94 της Επιτροπής της 28ης Οκτωβρίου 1994	L 280	43	29.10.1994
► <u>M11</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 656/95 της Επιτροπής της 28ης Μαρτίου 1995	L 69	1	29.3.1995
► <u>M12</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2527/95 της Επιτροπής της 27ης Οκτωβρίου 1995	L 258	49	28.10.1995
► <u>M13</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2472/97 της Επιτροπής της 11ης Δεκεμβρίου 1997	L 341	25	12.12.1997
► <u>M14</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 282/98 της Επιτροπής της 3ης Φεβρουαρίου 1998	L 28	5	4.2.1998
► <u>M15</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2248/98 της Επιτροπής της 19ης Οκτωβρίου 1998	L 282	55	20.10.1998
► <u>M16</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 379/1999 της Επιτροπής της 19ης Φεβρουαρίου 1999	L 46	15	20.2.1999
► <u>M17</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 455/2001 της Επιτροπής της 6ης Μαρτίου 2001	L 65	9	7.3.2001
► <u>M18</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2042/2001 της Επιτροπής της 18ης Οκτωβρίου 2001	L 276	8	19.10.2001
► <u>M19</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 796/2002 της Επιτροπής της 6ης Μαΐου 2002	L 128	8	15.5.2002
► <u>M20</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1989/2003 της Επιτροπής της 6ης Νοεμβρίου 2003	L 295	57	13.11.2003
► <u>M21</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 702/2007 της Επιτροπής της 21ης Ιουνίου 2007	L 161	11	22.6.2007
► <u>M22</u>	Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 640/2008 της Επιτροπής της 4ης Ιουλίου 2008	L 178	11	5.7.2008
► <u>M23</u>	Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 61/2011 της Επιτροπής της 24ης Ιανουαρίου 2011	L 23	1	27.1.2011
► <u>M24</u>	Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 661/2012 της Επιτροπής της 19ης Ιουλίου 2012	L 192	3	20.7.2012

- **M25** Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 299/2013 της Επιτροπής της 26ης
Μαρτίου 2013 L 90 52 28.3.2013

Διορθώνεται από:

- **C1** Διορθωτικό ΕΕ L 108 της 25.4.1992, σ. 57 (91/2568)
► **C2** Διορθωτικό ΕΕ L 176 της 20.7.1993, σ. 26 (93/183)



ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 11ης Ιουλίου 1991

σχετικά με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων καθώς και με τις μεθόδους προσδιορισμού

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας,

τον κανονισμό αριθ. 136/66/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 1966 περί δημιουργίας κοινής οργανώσεως αγοράς στον τομέα των λιπαρών ουσιών ⁽¹⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3577/90 ⁽²⁾, και ιδίως το άρθρο 35α,

Εκτιμώντας:

ότι στο παράρτημα του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ προβλέπονται η περιγραφή και ο ορισμός των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων που διατίθενται στο εμπόριο στο εσωτερικό κάθε κράτους μέλους, καθώς και όσον αφορά τις ενδοκοινοτικές συναλλαγές και τις συναλλαγές με τις τρίτες χώρες·

ότι, για να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός μεταξύ των διαφόρων τύπων ελαίου, θα πρέπει να καθοριστούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά κάθε ελαίου, καθώς και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παρθένων ελαίων, κατά τρόπο που να διασφαλίζεται η γνησιότητα και η ποιότητα των εν λόγω προϊόντων, με την επιφύλαξη των υπολοίπων διατάξεων, οι οποίες αφορούν αυτό το θέμα·

ότι θα πρέπει να προσδιοριστούν κατά ενιαίο τρόπο σε ολόκληρη την Κοινότητα τα χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων ελαίου· ότι, προς το σκοπό αυτό, θα πρέπει να καθοριστούν οι μέθοδοι, χημικής ανάλυσης και οργανοληπτικής αξιολόγησης στην Κοινότητα· ότι θα πρέπει, εντούτοις, να επιτραπεί κατά τη διάρκεια μεταβατικής περιόδου η χρησιμοποίηση άλλων μεθόδων ανάλυσης που εφαρμόζονται στα κράτη μέλη, προβλέποντας παράλληλα ότι, σε περίπτωση που τα αποτελέσματα παρουσιάζουν διαφορές, θα είναι καθοριστικά τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με βάση την ενιαία μέθοδο·

ότι ο προσδιορισμός των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του ελαιολάδου και των μεθόδων ανάλυσης οδηγεί στην προσαρμογή των συμπληρωματικών επεξηγήσεων του κεφαλαίου 15 της συνδυσασμένης ονοματολογίας·

ότι στην μέθοδο αξιολόγησης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παρθένων ελαίων περιλαμβάνεται η συγκρότηση ομάδος δοκιμαστών που έχουν επιλεγεί και εξασκηθεί ειδικά γι' αυτό· ότι είναι, επομένως, σκόπιμο να προβλεφθεί η προθεσμία η αναγκαία για την δημιουργία μιας τέτοιας υποδομής· ότι, λαμβανομένων υπόψη των δυσκολιών που θα συναντήσουν ορισμένα κράτη μέλη για την συγκρότηση ομάδων δοκιμαστών, είναι σκόπιμο να δοθεί άδεια να καταφεύγουν στις υπάρχουσες ομάδες άλλων κρατών μελών·

⁽¹⁾ ΕΕ αριθ. L 172 της 30.9.1966, σ. 3025/66.

⁽²⁾ ΕΕ αριθ. L 353 της 17.12.1990, σ. 23.

▼B

ότι, για να εξασφαλιστεί η ορθή λειτουργία του συστήματος των εισφορών που εφαρμόζονται κατά την εισαγωγή των ελαιοπυρήνων είναι σκόπιμο να προβλεφθεί μια ενιαία μέθοδος για τον καθορισμό της περιεκτικότητας σε έλαιο των εν λόγω προϊόντων·

ότι, για να μην προκληθεί ζημιά στο εμπόριο, είναι σκόπιμο να προβλεφθεί μια περιορισμένη περίοδος για την διάθεση του τυποποιημένου ελαιολάδου πρό της ενάρξεως του παρόντος κανονισμού·

ότι είναι σκόπιμο να καταργηθεί ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1058/77 της Επιτροπής ⁽¹⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1858/88 ⁽²⁾·

ότι η Επιτροπή Διαχείρισης Λιπαρών Ουσιών δεν διατύπωσε γνώμη εντός της ταχθείσας προθεσμίας,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

▼M20*Άρθρο 1*

1. Θεωρούνται παρθένα ελαιόλαδα, κατά την έννοια του σημείου 1 α) και β) του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, τα ελαιόλαδα των οποίων τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα Ι σημεία 1 και 2 του παρόντος κανονισμού.

2. Θεωρείται ελαιόλαδο λαμπάντε, κατά την έννοια του σημείου 1 γ) του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, το ελαιόλαδο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα Ι σημείο 3 του παρόντος κανονισμού.

3. Θεωρείται εξευγενισμένο ελαιόλαδο, κατά την έννοια του σημείου 2 του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, το ελαιόλαδο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα Ι σημείο 4 του παρόντος κανονισμού.

4. Θεωρείται ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένο ελαιόλαδο και παρθένα ελαιόλαδα, κατά την έννοια του σημείου 3 του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, το ελαιόλαδο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα Ι σημείο 5 του παρόντος κανονισμού.

5. Θεωρείται ακατέργαστο πυρηνέλαιο κατά την έννοια του σημείου 4 του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, το έλαιο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα Ι σημείο 6 του παρόντος κανονισμού.

6. Θεωρείται εξευγενισμένο πυρηνέλαιο, κατά την έννοια του σημείου 5 του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, το έλαιο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα Ι σημείο 7 του παρόντος κανονισμού.

7. Θεωρείται πυρηνέλαιο κατά την έννοια του σημείου 6 του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, το έλαιο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα Ι σημείο 8 του παρόντος κανονισμού.

⁽¹⁾ ΕΕ αριθ. L 128 της 24.5.1977, σ. 6.

⁽²⁾ ΕΕ αριθ. L 166 της 1.7.1988, σ. 10.

▼ B*Άρθρο 2*

1. Ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών των ελαίων που προβλέπονται στο παράρτημα I του παρόντος κανονισμού πραγματοποιείται σύμφωνα με τις εξής μεθόδους ανάλυσης:

- για τον προσδιορισμό των ελευθέρων λιπαρών οξέων, εκπεφρασμένων σε ποσοστό ελαϊκού οξέος, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα II,
- για τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα III,

▼ M19

- για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε κηρούς, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα IV,

▼ B

- για τον προσδιορισμό των στερολών, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα V,
- για τον προσδιορισμό της ερυθροδιόλης, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα VI,

▼ M21

- για τον προσδιορισμό της εκατοστιαίας αναλογίας 2-μονοπαλμιτικής, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα VII,

▼ M20

▼ B

- για την φασματοφωτομετρική ανάλυση, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα IX,
- για τον προσδιορισμό της συνθέσεως των λιπαρών οξέων, η μέθοδος που αναφέρεται στα παραρτήματα A και B.
- για τον προσδιορισμό των αλογονομένων πτητικών υδρογονανθράκων, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα XI,
- για την αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παρθένων ελαιολάδων, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα XII, που εφαρμόζεται σύμφωνα με την παράγραφο 2,

▼ M20

▼ M11

- για τον προσδιορισμό των στιγμασταδιενίων, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα XVII,

▼ M13

- για τον προσδιορισμό της συνθέσεως των τριγλυκεριδίων σε ECN42, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα XVIII,

▼ M19

- για τον προσδιορισμό του περιεχομένου σε αλειφατικές αλκοόλες, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα XIX,

▼ M23

- για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε κηρούς, καθώς και σε μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα XX.

▼ **M19**

2. Η εκτίμηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παρθένων ελαιολάδων από τις εθνικές αρχές ή τους αντιπροσώπους τους πραγματοποιείται από ομάδες δοκιμαστών αναγνωρισμένες από τα κράτη μέλη.

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός ελαιολάδου που αναφέρονται στο πρώτο εδάφιο θεωρούνται σύμφωνα με τη δηλούμενη κατηγορία του ελαιολάδου αν η αναγνωρισμένη από το υπόψη κράτος μέλος ομάδα επιβεβαιώσει τη συγκεκριμένη κατάταξη.

Στην περίπτωση που η αναγνωρισμένη ομάδα δεν επιβεβαιώσει τη δήλωση σε ό,τι αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της κατηγορίας του δηλωθέντος ελαιολάδου, οι εθνικές αρχές ή οι αντιπρόσωποί τους διενεργούν ύστερα από αίτηση του ενδιαφερομένου δύο κατ' έφεση αναλύσεις από άλλες αναγνωρισμένες ομάδες, από τις οποίες η μία τουλάχιστον πραγματοποιείται από ομάδα αναγνωρισμένη από το κράτος μέλος παραγωγής του ελαιολάδου. Τα υπόψη χαρακτηριστικά θεωρούνται σύμφωνα με τα δηλωθέντα αν οι δύο κατ' έφεση αναλύσεις επιβεβαιώσουν τη συγκεκριμένη κατάταξη. Σε αντίθετη περίπτωση τα έξοδα των κατέφεση αναλύσεων, με την επιφύλαξη των κυρώσεων που έχουν επιβληθεί, καταλογίζονται στον ενδιαφερόμενο.

▼ **M17**

3. Όσον αφορά τους ελέγχους που διενεργούνται από τις εθνικές αρχές ή τους αντιπροσώπους τους για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαίων που προβλέπονται στην παράγραφο 1, η δειγματοληψία διενεργείται σύμφωνα με τις διεθνείς προδιαγραφές EN ISO 661 και EN ISO 5555 σχετικά με την προετοιμασία δείγματος υποβαλλόμενου σε δοκιμή και με τη δειγματοληψία. Ωστόσο, κατά παρέκκλιση από το σημείο 6.8 της προδιαγραφής EN ISO 5555, για τις παρτίδες που αποτελούνται από τα εν λόγω έλαια, σε άμεσες συσκευασίες μικρότερες ή ίσες από 100 λίτρα, η δειγματοληψία διενεργείται σύμφωνα με το παράρτημα Ια του παρόντος κανονισμού.

▼ **M19**

Με την επιφύλαξη των διατάξεων της προδιαγραφής EN ISO 5555 και του κεφαλαίου 6 της προδιαγραφής EN ISO 661, τα δείγματα προφυλάσσονται από το φως και από υψηλές θερμοκρασίες το ταχύτερο δυνατό και αποστέλλονται στο εργαστήριο για τις αναλύσεις το αργότερο:

- τη δέκατη εργάσιμη ημέρα ύστερα από εκείνη της λήψης, κατά τους μήνες Οκτώβριο έως Μάιο και
- την πέμπτη εργάσιμη ημέρα ύστερα από εκείνη της λήψης, κατά τους μήνες από Ιούνιο έως Σεπτέμβριο.

▼ **M17**

4. ► **M20** Για τους ελέγχους που προβλέπονται στην παράγραφο 3, οι αναλύσεις που αναφέρονται στα παραρτήματα II, III, IX, X και XII, καθώς και, ενδεχομένως, οι κατ' αντιπαράθεση αναλύσεις που προβλέπονται από τις εθνικές νομοθεσίες διεξάγονται πριν από την ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας. Στην περίπτωση που η δειγματοληψία πραγματοποιείται άνω των τεσσάρων μηνών πριν από την ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας, οι εν λόγω αναλύσεις πρέπει να πραγματοποιούνται το αργότερο τον τέταρτο μήνα που ακολουθεί τον μήνα της δειγματοληψίας. Δεν εφαρμόζεται καμία αναβολή για τις άλλες αναλύσεις που προβλέπονται από τον εν λόγω κανονισμό. ◀

▼ **M17**

Εκτός εάν η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κάτω του ενός μηνός πριν από την ημερομηνία της ελάχιστης διατηρησιμότητας, στην περίπτωση κατά την οποία τα αποτελέσματα των αναλύσεων δεν αντιστοιχούν στα χαρακτηριστικά της κατηγορίας του ελαιόλαδου ή του πυρηνελαίου που δηλώθηκε, ο ενδιαφερόμενος ενημερώνεται το αργότερο ένα μήνα πριν από τη λήξη της προθεσμίας που αναφέρεται στο πρώτο εδάφιο.

▼ **M19**

5. Ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων πραγματοποιείται με τις μεθόδους που προβλέπονται στην παράγραφο 1, και τα αποτελέσματα των αναλύσεων συγκρίνονται απευθείας με τα όρια που προβλέπονται από τον παρόντα κανονισμό.

▼ **M25***Άρθρο 2α*

1. Για τους σκοπούς του παρόντος άρθρου, ως «ελαιόλαδο που διατίθεται στο εμπόριο» νοείται η συνολική ποσότητα ελαιολάδου και πυρηνελαίου ενός δεδομένου κράτους μέλους, η οποία καταναλώνεται στο εν λόγω κράτος μέλος ή εξάγεται από το εν λόγω κράτος μέλος.

2. Τα κράτη μέλη εξασφαλίζουν ότι οι έλεγχοι συμμόρφωσης πραγματοποιούνται επιλεκτικά, βάσει ανάλυσης κινδύνου, με την απαραίτητη συχνότητα, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η συμφωνία του ελαιολάδου που διατίθεται στο εμπόριο με τη δηλωθείσα κατηγορία.

3. Τα κριτήρια αξιολόγησης του κινδύνου μπορεί να περιλαμβάνουν:

- α) την κατηγορία του ελαίου, την περίοδο παραγωγής, την τιμή των ελαίων σε σχέση με άλλα φυτικά έλαια, τις εργασίες ανάμειξης και συσκευασίας, τις εγκαταστάσεις και τις συνθήκες αποθήκευσης, τη χώρα καταγωγής, τη χώρα προορισμού, τα μέσα μεταφοράς ή την ποσότητα της παρτίδας·
- β) τη θέση των επιχειρήσεων στην αλυσίδα εμπορίας, την ποσότητα και/ή την αξία των προϊόντων που διαθέτουν στο εμπόριο, το φάσμα των κατηγοριών ελαίων που διαθέτουν στο εμπόριο, τον τύπο των δραστηριοτήτων που ασκούν, όπως η έκθλιψη, η αποθήκευση, το ραφινάρισμα, η ανάμειξη, η συσκευασία ή η λιανική πώληση·
- γ) τα πορίσματα από προηγούμενους ελέγχους, συμπεριλαμβανομένων του αριθμού και του τύπου των ελαττωμάτων που διαπιστώθηκαν, τη συνήθη ποιότητα των ελαίων που διατίθενται στο εμπόριο, τις επιδόσεις του χρησιμοποιούμενου τεχνικού εξοπλισμού·
- δ) την αξιοπιστία των συστημάτων διασφάλισης της ποιότητας των επιχειρήσεων ή των συστημάτων αυτοελέγχου σε σχέση με τη συμμόρφωση προς τις προδιαγραφές εμπορίας·
- ε) τον τόπο διενέργειας του ελέγχου, ιδίως εάν αυτός είναι το σημείο πρώτης εισόδου στην Ένωση, το σημείο τελευταίας εξόδου από την Ένωση ή ο τόπος παραγωγής, συσκευασίας, φόρτωσης ή πώλησης των ελαίων στον τελικό καταναλωτή·
- στ) κάθε άλλη πληροφορία που θα μπορούσε να δηλώνει κίνδυνο μη συμμόρφωσης.

4. Τα κράτη μέλη θεσπίζουν εκ των προτέρων:

- α) τα κριτήρια αξιολόγησης του κινδύνου μη συμμόρφωσης παρτίδων·
- β) βάσει ανάλυσης κινδύνου για κάθε κατηγορία κινδύνου, τον ελάχιστο αριθμό επιχειρήσεων ή παρτίδων και/ή ποσοτήτων που θα αποτελέσουν αντικείμενο ελέγχου συμμόρφωσης.

▼ M25

Διενεργείται τουλάχιστον ένας ετήσιος έλεγχος συμμόρφωσης ανά χίλιους τόνους ελαιολάδου που διατίθεται στο εμπόριο στο κράτος μέλος.

5. Τα κράτη μέλη επαληθεύουν τη συμμόρφωση:

- α) με τη διεξαγωγή των αναλύσεων που προβλέπονται στο παράρτημα I, ανεξαρτήτως σειράς· ή
- β) σύμφωνα με τη σειρά που προβλέπεται στο παράρτημα Ιβ σχετικά με το διάγραμμα αποφάσεων, μέχρι να υπάρξει κατάληξη σε μία από τις αποφάσεις που αναφέρονται από το εν λόγω διάγραμμα.

▼ M19**▼ M25***Άρθρο 3*

Στην περίπτωση που διαπιστώνεται ότι ένα ελαιόλαδο διαφέρει από την περιγραφή της κατηγορίας του, το ενδιαφερόμενο κράτος μέλος επιβάλλει, με την επιφύλαξη άλλων ενδεχομένων κυρώσεων, αποτελεσματικές, αναλογικές και αποτρεπτικές κυρώσεις οι οποίες καθορίζονται ανάλογα με τη σοβαρότητα της διαπιστωθείσας παρατυπίας.

Όταν από τους ελέγχους προκύπτουν σημαντικές παρατυπίες, τα κράτη μέλη αυξάνουν τη συχνότητα των ελέγχων σε σχέση με το στάδιο εμπορίας, την κατηγορία ελαιολάδου, την καταγωγή ή άλλα κριτήρια.

▼ M5*Άρθρο 4***▼ M19**

1. Για την εκτίμηση και τον έλεγχο από τις αρμόδιες αρχές ή τον εκπρόσωπό τους των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, τα κράτη μέλη δύνανται να αναγνωρίζουν ομάδες δοκιμαστών.

Οι όροι αναγνώρισης καθορίζονται από τα κράτη μέλη έτσι, κυρίως, ώστε:

- να ανταποκρίνονται στους όρους του παραρτήματος XII σημείο 4,
- να διασφαλίζεται ότι η κατάρτιση του επικεφαλής της ομάδας πραγματοποιείται από ίδρυμα και υπό προϋποθέσεις αναγνωρισμένες για το σκοπό αυτό από το κράτος μέλος,
- η εγκυρότητα των λαμβανόμενων αποτελεσμάτων των εξετάσεων να υπόκειται σε σύστημα ετήσιου ελέγχου διαμορφωμένο από το κράτος μέλος.

Κάθε κράτος μέλος κοινοποιεί στην Επιτροπή κατάλογο των αναγνωρισμένων ομάδων καθώς και τα μέτρα που ελήφθησαν σύμφωνα με την παρούσα παράγραφο.

▼ M5

2. Στην περίπτωση που ένα κράτος αντιμετωπίζει δυσκολίες για να συγκροτήσει επιτροπή δοκιμαστών στην επικράτειά του, μπορεί να προσφύγει σε αναγνωρισμένη επιτροπή δοκιμαστών σε ένα άλλο κράτος μέλος.

3. Κάθε κράτος μέλος καθορίζει τον κατάλογο των επιτροπών δοκιμαστών που συγκροτούνται από τις επαγγελματικές ή διεπαγγελματικές οργανώσεις σύμφωνα με τους όρους που περιγράφονται στην παράγραφο 1 και μεριμνά για την τήρηση των όρων αυτών.

▼ M19**▼ B***Άρθρο 6*

1. Η περιεκτικότητα σε έλαιο των ελαιοπυρήνων και των άλλων υπολειμμάτων εκχύλισης του ελαιολάδου (κωδικός ΣΟ 2306 90 11 και 2306 90 19) προσδιορίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στο παράρτημα XV.

▼B

2. Η περιεκτικότητα σε έλαιο που αναφέρεται στην παράγραφο 1 είναι εκπεφρασμένη επί του 3 % κατά βάρος επί ξηράς ουσίας.

▼M20*Άρθρο 7*

Εφαρμόζονται οι κοινοτικές διατάξεις όσον αφορά την παρουσία επιμολυντών.

Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε αλογονωμένους διαλύτες τα όρια για όλες τις κατηγορίες ελαιολάδου είναι τα ακόλουθα:

- ανώτατη περιεκτικότητα κάθε αλογονωμένου διαλύτη που έχει ανιχνευθεί 0,1 mg/kg,
- ανώτατη συνολική περιεκτικότητα των αλογονωμένων διαλυτών που έχουν ανιχνευθεί 0,2 mg/kg.

▼M25*Άρθρο 7a*

Τα φυσικά ή νομικά πρόσωπα και οι ομάδες προσώπων που έχουν στην κατοχή τους, για την άσκηση του επαγγέλματός τους ή για εμπορικούς σκοπούς, ελαιόλαδο και πυρηνέλαιο από το στάδιο της έκθλιψης στο ελαιοτριβείο μέχρι και την εμφιάλωση, υποχρεούνται να τηρούν μητρώα στα οποία καταγράφονται η είσοδος και η έξοδος κάθε κατηγορίας των ελαίων αυτών.

Τα κράτη μέλη μεριμνούν για την εκπλήρωση της υποχρέωσης που προβλέπεται στο πρώτο εδάφιο.

Άρθρο 8

1. Τα κράτη μέλη κοινοποιούν στην Επιτροπή τα μέτρα εφαρμογής του παρόντος κανονισμού. Γνωστοποιούν στην Επιτροπή οποιεσδήποτε μεταγενέστερες τροποποιήσεις.

▼B

2. Τα κράτη μέλη κοινοποιούν στην Επιτροπή, στην αρχή κάθε εξαμήνου τα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν κατά το προηγούμενο εξάμηνο.

Τα αποτελέσματα αυτά εξετάζονται από την Επιτροπή Διαχείρισης Λιπαρών Ουσιών σύμφωνα με τη διαδικασία που προβλέπεται από το άρθρο 39 του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ.

▼M25

3. Οι κοινοποιήσεις που αναφέρονται στον παρόντα κανονισμό υποβάλλονται σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 792/2009 της Επιτροπής⁽¹⁾.

▼B*Άρθρο 9*

Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1058/77 καταργείται.

Άρθρο 10

1. Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Η εφαρμογή της μεθόδου του παραρτήματος XII αρχίζει από την ►**M1** 1η Νοεμβρίου 1992 ◄, εξαιρουμένων των διαδικασιών των σχετικών με την παρέμβαση.

⁽¹⁾ ΕΕ L 228 της 1.9.2009, σ. 3.

▼ M5

Η μέθοδος αυτή δεν εφαρμόζεται στα παρθένα ελαιόλαδα που συσκευάζονται πριν από την 1η Νοεμβρίου 1992.

▼ B

2. Ο παρών κανονισμός δεν ισχύει για τα ελαιόλαδα και τα πυρηνέλαια που συσκευάστηκαν έως την ημερομηνία έναρξης ισχύος του παρόντος κανονισμού και τέθηκαν στο εμπόριο έως τις 31 Οκτωβρίου 1992.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

▼ B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Σύνοψη

Παράρτημα I:	Χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου
Παράρτημα Ia:	Δειγματοληψία των παρτίδων ελαιόλαδου ή πυρηνελαίου ελιών σε άμεσες συσκευασίες των 100 λίτρων κατ' ανώτατο όριο
Παράρτημα Ib:	Διάγραμμα αποφάσεων
Παράρτημα II:	► M21 Προσδιορισμός των ελευθέρων λιπαρών οξέων, εν ψυχρώ μέθοδος ◄
Παράρτημα III:	Προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων
Παράρτημα IV:	► M6 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε κηρούς διά χρωματογραφίας αερίου φάσεως με τριχοειδή στήλη ◄
Παράρτημα V:	Προσδιορισμός της σύνθεσης και του περιεχομένου των στερολών δι' αερίου χρωματογραφίας με τριχοειδή στήλη
Παράρτημα VI:	Προσδιορισμός ερυθροδιόλης και ουβαόλης
Παράρτημα VII:	► M21 Προσδιορισμός της εκατοστιαίας αναλογίας 2-μονοπαλμιτίνης ◄

▼ **M20**▼ B

Παράρτημα IX:	Φασματοφωτομετρική εξέταση υπεριώδους
Παράρτημα XA:	Ανάλυση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων δι' αερίου χρωματογραφίας
Παράρτημα XB:	Παρασκευή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων σύμφωνα με το παράρτημα VI, σημεία I και II του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 72/77 ή σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται κατωτέρω
Παράρτημα XI:	Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε αλογονούχους πτητικούς διαλύτες
Παράρτημα XII:	Οργανοληπτική αξιολόγηση του παρθένου ελαιολάδου

▼ **M20**▼ **M19**▼ B

Παράρτημα XV:	Περιεκτικότητα σε έλαιο των ελαιοπυρήνων
Παράρτημα XVI:	Προσδιορισμός του αριθμού ιωδίου
Παράρτημα XVII:	Μέθοδος προσδιορισμού των στιγμασταδιενίων στα φυτικά έλαια
Παράρτημα XVIII:	Προσδιορισμός της διαφορας μεταξύ πραγματικής και θεωρητικής περιεκτικότητας σε τριακυλογλυκερολες με ECN 42
Παράρτημα XIX:	Μέθοδος προσδιορισμού του περιεχομένου σε αλειφατικές αλκοόλες

▼ **M23**

Παράρτημα XX:	Μέθοδος προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε κηρούς, καθώς και σε μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης
---------------	---

▼ **M25**

Παράρτημα XXI:	Αποτελέσματα των αναφερόμενων στο άρθρο 8 παράγραφος 2 ελέγχων συμμόρφωσης για τα ελαιόλαδα
----------------	---

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Κατηγορία	Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME) και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAEE)	Οξύτητα (%) (*)	Αριθμός υπεροξειδίων mEq O ₂ /kg (*)	Κηροί mg/kg (**)	2-μονοπαλμιτικό γλυκερύλιο (%)	Στιγμαστ-αδιένιο mg/kg ⁽¹⁾	Διαφορά ECN42(H-PLC) και ECN42 (θεωρητικός υπολογισμός)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	ΔK (*)	Οργανοληπτική εξέταση Διάμεσος του ελαττώματος (Md) (*)	Οργανοληπτική εξέταση Διάμεσος του φρουτώδους (Mf) (*)
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg ή 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg και (FAEE/FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14 % ≤ 1,0 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Παρθένο ελαιόλαδο	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14 % ≤ 1,0 1,0 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
3. Ελαιόλαδο λαμπάντε	—	> 2,0	—	≤ 300 ⁽³⁾	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14 % ≤ 1,1 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 ⁽²⁾	—
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14 % ≤ 1,1 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—

▼ M23

Κατηγορία	Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME) και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAEE)	Οξύτητα (%) (*)	Αριθμός υπεροξειδίων mEq O ₂ /kg (*)	Κηροί mg/kg (**)	2-μονοπαλμιτικό γλυκερύλιο (%)	Στιγμαστ-αδιένιο mg/kg ⁽¹⁾	Διαφορά ECN42(H-PLC) και ECN42 (θεωρητικός υπολογισμός)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	ΔΚ (*)	Οργανοληπτική εξέταση Διάμεσος του ελαττώματος (Md) (*)	Οργανοληπτική εξέταση Διάμεσος του φρουτώδους (Mf) (*)
5. Σύνθετο ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14 % ≤ 1,0 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	—	—	—	> 350 ⁽⁴⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Πυρηνέλαιο	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

⁽¹⁾ Άθροισμα των ισομερών που θα μπορούσαν να διαχωριστούν (ή όχι) με τριχοειδή στήλη.

⁽²⁾ Ή εάν η διάμεσος του ελαττώματος είναι μικρότερη ή ίση με 3,5 και η διάμεσος του φρουτώδους ισούται με 0.

⁽³⁾ Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ελαιόλαδα λαμπάντε, εάν η περιεκτικότητα σε ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι χαμηλότερη ή ίση με 350 mg/kg ή εάν η περιεκτικότητα σε ερυθροδιόλη και ουβαόλη είναι μικρότερη ή ίση με 3,5 %.

⁽⁴⁾ Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ακατέργαστα πυρηνέλαια, εάν η περιεκτικότητα σε ολικές αλειφατικές αλκοόλες υπερβαίνει τα 350 mg/kg και η περιεκτικότητα σε ερυθροδιόλη και ουβαόλη υπερβαίνει το 3,5 %.

Κατηγορία	Περιεκτικότητα σε οξέα ⁽¹⁾						Ολικά ισομερή του trans- ελαιϊ- κού οξέος (%)	Ολικά ισομερή του trans- ελαιϊ- κού οξέος (%)	Σύνθεση των στερολών						Ολικές στερόλες (mg/kg)	Ερυθροδι- όλη και ουβαόλη (%) (**)
	Μυριστικό (%)	Λινολεν- ικό (%)	Αραχιδι- κό (%)	Εικοσεν- ικό (%)	Βεχενικό (%)	Λιγνοκ- ηρικό (%)			Χοληστ- ερόλη (%)	Βρασι- αστερό- λη (%)	Καμπε- στερόλη (%)	Στιγμαστε- ρόλη (%)	β- Σιτοστερόλη (%) ⁽²⁾	δ-7 Στιγμα- στενόλη (%)		
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Ελαιόλαδο λαμπάντε	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Σύνθετο ελαιόλαδο αποτε- λούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾
7. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Πυρηνέλαιο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

(1) Περιεκτικότητα σε άλλα λιπαρά οξέα (%): παλμιτικό: 7,5-20,0· παλμιτελαϊκό: 0,3-3,5· δεκαεπτανικό: ≤ 0,3· δεκαεπτενικό: ≤ 0,3· στεατικό: 0,5-5,0· ελαϊκό: 55,0 - 83,0· λιγελαϊκό: 3,5-21,0.
(2) Άθροισμα: δ-5,23-στιγμασταδιενόλη + κλεροστερόλη + β-σιτοστερόλη + σιτοστανόλη + δ-5-αβεναστερόλη + δ-5,24-στιγμασταδιενόλη.
(3) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ελαιόλαδα λαμπάντε, εάν η περιεκτικότητα σε ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι χαμηλότερη ή ίση με 350 mg/kg ή εάν η περιεκτικότητα σε ερυθροδιόλη και ουβαόλη είναι μικρότερη ή ίση με 3,5 %.
(4) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ακατέργαστα πυρηνέλαια, εάν η περιεκτικότητα σε ολικές αλειφατικές αλκοόλες υπερβαίνει τα 350 mg/kg και η περιεκτικότητα σε ερυθροδιόλη και ουβαόλη υπερβαίνει το 3,5 %.

Σημειώσεις:

- α) Τα αποτελέσματα των αναλύσεων πρέπει να εκφράζονται με τον αριθμό δεκαδικών ψηφίων που προβλέπεται για κάθε χαρακτηριστικό.
Το τελευταίο αριθμητικό ψηφίο πρέπει να αυξάνεται κατά μία μονάδα, εάν το επόμενο ψηφίο είναι μεγαλύτερο από 4.
β) Αρκεί έστω και ένα χαρακτηριστικό να μην ανταποκρίνεται στις αναγραφόμενες τιμές για να καταταχθεί το ελαιόλαδο σε άλλη κατηγορία ή να δηλωθεί ότι δεν είναι καθαρό για τους σκοπούς του παρόντος κανονισμού.
γ) Τα αναφερόμενα στην ποιότητα του ελαιολάδου χαρακτηριστικά που σημειώνονται με αστερίσκο (*) υποδηλώνουν ότι:
— προκειμένου για ελαιόλαδο λαμπάντε, τα δύο σχετικά όρια μπορούν να διαφέρουν συγχρόνως από τις αναγραφόμενες τιμές,
— προκειμένου για παρθένο ελαιόλαδο, η διαφορά ενός τουλάχιστον από τα όρια αυτά από τις αναγραφόμενες τιμές συνεπάγεται αλλαγή κατηγορίας, το ελαιόλαδο όμως εξακολουθεί να κατατάσσεται σε μία από τις κατηγορίες παρθένου ελαιολάδου.
δ) Τα αναφερόμενα στην ποιότητα του ελαιολάδου χαρακτηριστικά που σημειώνονται με διπλό αστερίσκο (**) υποδηλώνουν ότι, για όλα τα είδη πυρηνελαιών, τα δύο σχετικά όρια μπορούν να διαφέρουν συγχρόνως από τις αναγραφόμενες τιμές.

▼ **M20***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ia***Δειγματοληψία ελαιολάδου ή πυρηνελαίου που παραδίδονται σε άμεσες συσκευασίες των 100 λίτρων κατ' ανώτατο όριο**

Η παρούσα μέθοδος δειγματοληψίας εφαρμόζεται για παραδόσεις ελαιολάδου ή πυρηνελαίου κατ' ανώτατο όριο 125 000 λίτρων, που είναι συσκευασμένες σε άμεσες συσκευασίες των 100 λίτρων, κατ' ανώτατο όριο.

Όταν η παράδοση είναι μεγαλύτερη από 125 000 λίτρα, υποδιαιρείται σε παρτίδες, ίσες ή μικρότερες από 125 000 λίτρα. Όταν η παράδοση είναι μικρότερη από 125 000 λίτρα αποτελεί μία παρτίδα. Η μέθοδος εφαρμόζεται στην περίπτωση αυτή σε κάθε παρτίδα.

Σε συνάρτηση με το μέγεθος της παρτίδας, καθορίζεται ο ελάχιστος αριθμός των βασικών δειγμάτων, σύμφωνα με τον πίνακα που εμφανίζεται στο σημείο 1.

Η σημασία του βασικού δείγματος καθορίζεται από τη χωρητικότητα των άμεσων συσκευασιών, σύμφωνα με τον πίνακα που προβλέπεται στο σημείο 2.1.

Θεωρείται ως παράδοση, βασικό δείγμα και εργαστηριακό δείγμα, ότι αναφέρεται στους ορισμούς της προδιαγραφής EN ISO 5555.

Θεωρείται ως «παρτίδα» ένα σύνολο μονάδων πώλησης που παράγονται, παρασκευάζονται και συσκευάζονται σε τέτοιες συνθήκες ώστε το έλαιο που περιέχεται σε καθεμία από αυτές τις μονάδες πώλησης να θεωρείται ομοιογενές ως προς όλα τα αναλυτικά χαρακτηριστικά.

1. ΑΡΙΘΜΟΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ο ελάχιστος αριθμός των βασικών δειγμάτων καθορίζεται σε συνάρτηση με το μέγεθος της παρτίδας σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Μέγεθος της παρτίδας (σε λίτρα) κατώτερο από	Ελάχιστος αριθμός βασικών δειγμάτων
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125 000	5

Οι άμεσες συσκευασίες του ίδιου βασικού δείγματος πρέπει να επιλέγονται από γειτονικά σημεία της παρτίδας.

Σε περίπτωση αμφιβολίας, το κράτος μέλος αυξάνει τον αριθμό των βασικών δειγμάτων που πρέπει να ληφθούν.

2. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΕΝΟΣ ΒΑΣΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**2.1 Κάθε βασικό δείγμα αποτελείται από:**

Σε περίπτωση που οι άμεσες συσκευασίες έχουν χωρητικότητα:	Το βασικό δείγμα αφορά το έλαιο:
α) Μεγαλύτερη ή ίση από 5 λίτρα	α) Τριών άμεσων συσκευασιών
β) Μεγαλύτερη ή ίση από 3 λίτρα και μικρότερη από 5 λίτρα	β) Τριών άμεσων συσκευασιών
γ) Μεγαλύτερη ή ίση από 2 λίτρα και μικρότερη από 3 λίτρα	γ) Τριών άμεσων συσκευασιών
δ) Μεγαλύτερη ή ίση από 1 λίτρο και μικρότερη από 2 λίτρα	δ) Έξι άμεσων συσκευασιών
ε) Μεγαλύτερη ή ίση από 0,75 λίτρα και μικρότερη από 1 λίτρο	ε) Έξι άμεσων συσκευασιών
στ) Μικρότερη από 0,75 λίτρα	στ) Τρεις φορές το έλαιο του ελάχιστου αριθμού συσκευασιών, των οποίων η συνολική χωρητικότητα υπερβαίνει τα 1,5 λίτρα

▼ **M20**

2.2 Τα βασικά δείγματα πρέπει να διατηρούνται στις άμεσες συσκευασίες μέχρι τη στιγμή των αναλύσεων. Το έλαιο των βασικών δειγμάτων στη συνέχεια, ενδεχομένως, υποδιαιρείται σε τρία εργαστηριακά δείγματα για να πραγματοποιηθούν:

- α) οι αναλύσεις που αναφέρονται στα παραρτήματα II, III, IX και X·
- β) η ανάλυση που αναφέρεται στο παράρτημα XII·
- γ) οι λοιπές αναλύσεις.

2.3 Οι συσκευασίες που αποτελούν ένα βασικό δείγμα υποδιαιρούνται σύμφωνα με τις διαδικασίες ελέγχου που προβλέπονται από τις εθνικές νομοθεσίες.

3. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α) Κάθε ένα από τα βασικά δείγματα που αναφέρεται στο σημείο 1, υποδιαιρείται σε εργαστηριακά δείγματα, σύμφωνα με το σημείο 2.5 της προδιαγραφής EN ISO 5555, για να υποβληθεί στις ακόλουθες αναλύσεις:

- προσδιορισμός των ελεύθερων λιπαρών οξέων, όπως αναφέρεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 πρώτη περίπτωση,
- προσδιορισμός του δείκτη υπεροξειδίων, όπως αναφέρεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 δεύτερη περίπτωση,
- φασματοφωτομετρική ανάλυση, όπως αναφέρεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 όγδοη περίπτωση,
- σύνθεση σε λιπαρά οξέα, όπως αναφέρεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 ένατη περίπτωση.

β) Στην περίπτωση που, για τουλάχιστον ένα από τα βασικά δείγματα που ελήφθησαν στην ίδια παρτίδα, τα αποτελέσματα των αναλύσεων που αναφέρονται στο στοιχείο α) δεν συμφωνούν με όλα στα χαρακτηριστικά της δηλωθείσας κατηγορίας ελαίου, το σύνολο της παρτίδας θεωρείται ως μη σύμφωνο.

Σε περίπτωση που για καθένα από τα βασικά δείγματα που ελήφθησαν στην ίδια παρτίδα, τα αποτελέσματα των αναλύσεων που αναφέρονται στο στοιχείο α) δεν είναι όλα ομοιογενή, λαμβανομένων υπόψη των χαρακτηριστικών επαναληψιμότητας των σχετικών μεθόδων, το σύνολο της παρτίδας δηλώνεται ως μη ομοιογενές και κάθε βασικό δείγμα υποβάλλεται στις άλλες απαιτούμενες αναλύσεις. Σε αντίθετη περίπτωση, ένα μόνον από τα βασικά δείγματα της εν λόγω παρτίδας υποβάλλεται στις απαιτούμενες αναλύσεις.

γ) Σε περίπτωση που ένα από τα αποτελέσματα των αναλύσεων που αναφέρονται στο στοιχείο β) δεύτερο εδάφιο δεν ανταποκρίνεται στα χαρακτηριστικά της κατηγορίας ελαίου που δηλώθηκε, το σύνολο της σχετικής παρτίδας θεωρείται μη σύμφωνο.

Σε περίπτωση που όλα τα αποτελέσματα των αναλύσεων που αναφέρονται στο στοιχείο β) δεύτερο εδάφιο συμφωνούν με τα χαρακτηριστικά της κατηγορίας ελαίου που δηλώθηκε, το σύνολο της παρτίδας θεωρείται σύμφωνο.

▼ **M20***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ιβ***Διάγραμμα αποφάσεων για την εξακρίβωση της συμφωνίας ενός δείγματος ελαιολάδου με τη δηλωθείσα κατηγορία**

Η ανάλυση της συμφωνίας ενός ελαιολάδου ή ενός πυρηνελαίου προς τη δηλωθείσα κατηγορία δύναται να διεξαχθεί:

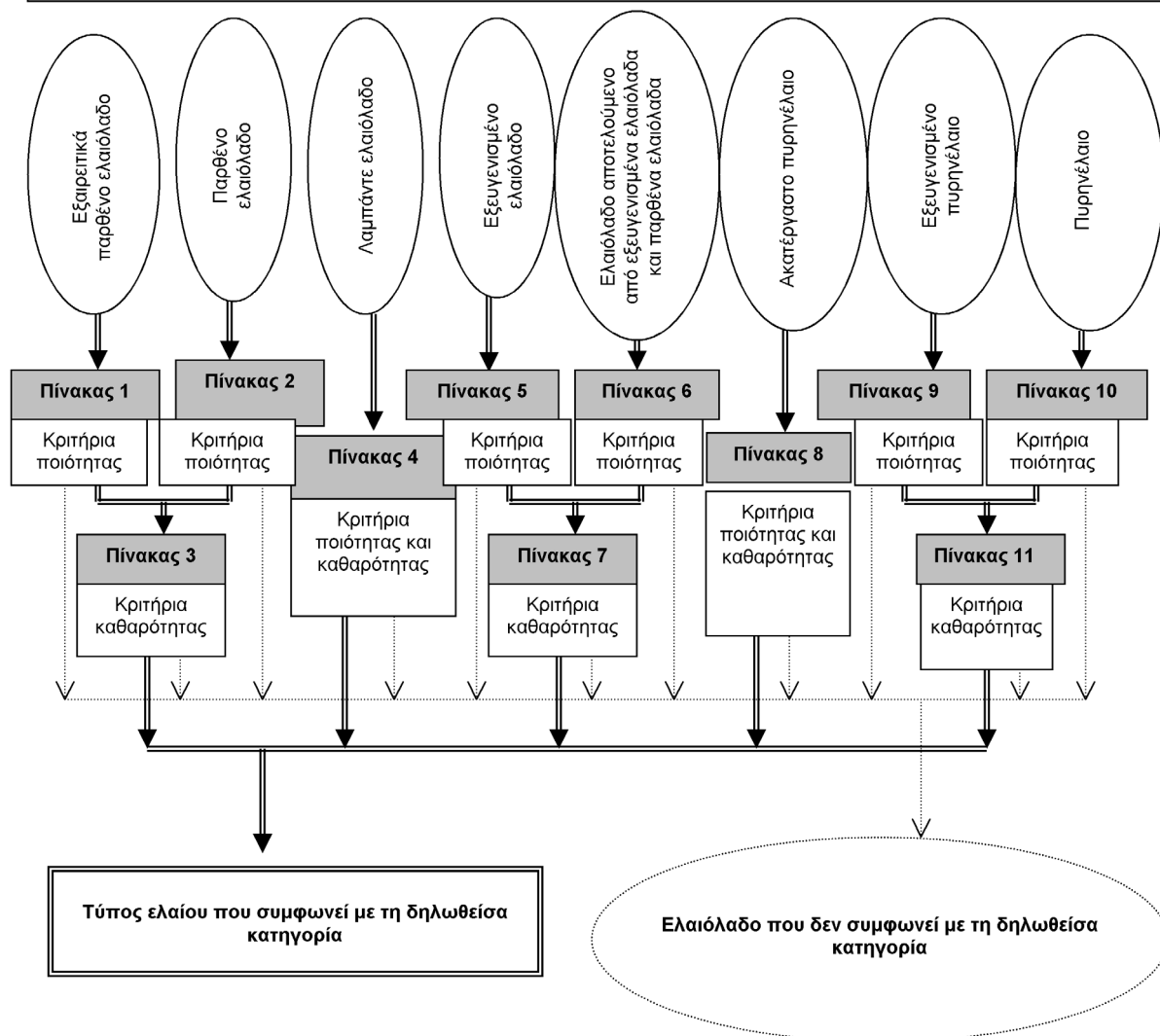
- α) είτε με την πραγματοποίηση, με οποιαδήποτε σειρά, των αναλύσεων που προβλέπονται για να εξακριβωθεί η τήρηση των χαρακτηριστικών που αναφέρονται στο παράρτημα Ι·
- β) είτε με την πραγματοποίηση, με τη σειρά που αναφέρεται στο διάγραμμα αποφάσεων, των αναλύσεων που προβλέπονται σε αυτό, μέχρι να φθάσουμε σε μια από τις αποφάσεις που αναφέρονται από το εν λόγω διάγραμμα αποφάσεων.

Οι αναλύσεις που αφορούν τους επιμολυντές, που είναι αναγκαίες για να εξακριβωθεί η συμφωνία με τους κανόνες της Ευρωπαϊκής Κοινότητας πρέπει να διεξαχθούν ξεχωριστά.

Το διάγραμμα αποφάσεων εφαρμόζεται σε όλες τις κατηγορίες ελαιολάδου και πυρηνελαίου. Αποτελείται από πίνακες αριθμημένους από 1 έως 11 οι οποίοι πρέπει να συμπληρωθούν σε συνάρτηση με την κατηγορία για την οποία έχει δηλωθεί το ελαιόλαδο, με τη σειρά που προβλέπεται στον γενικό πίνακα.

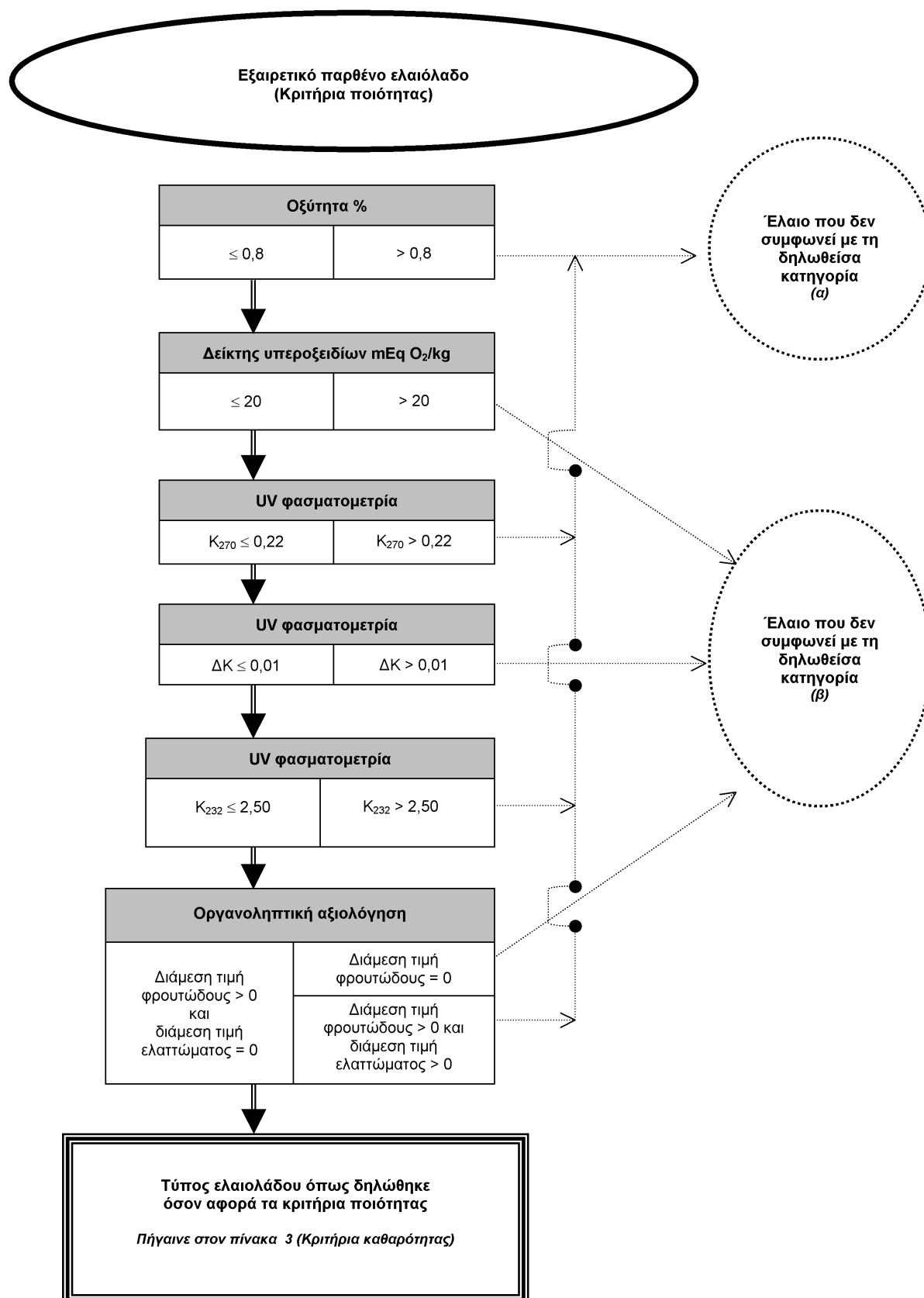
Για την ανάγνωση του γενικού πίνακα στον πίνακα 11:

- η διπλή γραμμή (=) δείχνει την πορεία που πρέπει να ακολουθηθεί σε περίπτωση συμφωνίας (θετική απάντηση) με τους όρους που προβλέπονται στο προηγούμενο τετραγωνίδιο. Η διάστικτη γραμμή (...) δείχνει την αντίθετη πορεία που πρέπει να ακολουθηθεί σε περίπτωση μη συμφωνίας,
- οι τίτλοι των τετραγωνιδίων που εμφανίζονται στους πίνακες 1 έως 11 αναφέρονται στις αναλύσεις που προβλέπονται από τον παρόντα κανονισμό σύμφωνα με τις αντιστοιχίες που αναφέρονται στο προσάρτημα 1 του παρόντος παραρτήματος,
- τα γράμματα της παραπομπής που εμφανίζονται στους κύκλους της αρνητικής απόφασης των πινάκων 1 έως 11 αντιστοιχούν στις ενδεικτικές πληροφορίες που αναφέρονται στο προσάρτημα 2 του παρόντος παραρτήματος. Δεν συνεπάγονται από μόνα τους την υποχρέωση να συνεχιστούν οι αναλύσεις ή τη επιβεβαίωση των υποθέσεων που αναφέρθηκαν.

▼ **M20****Γενικός πίνακας****Ελαιόλαδο που δηλώθηκε ως:**

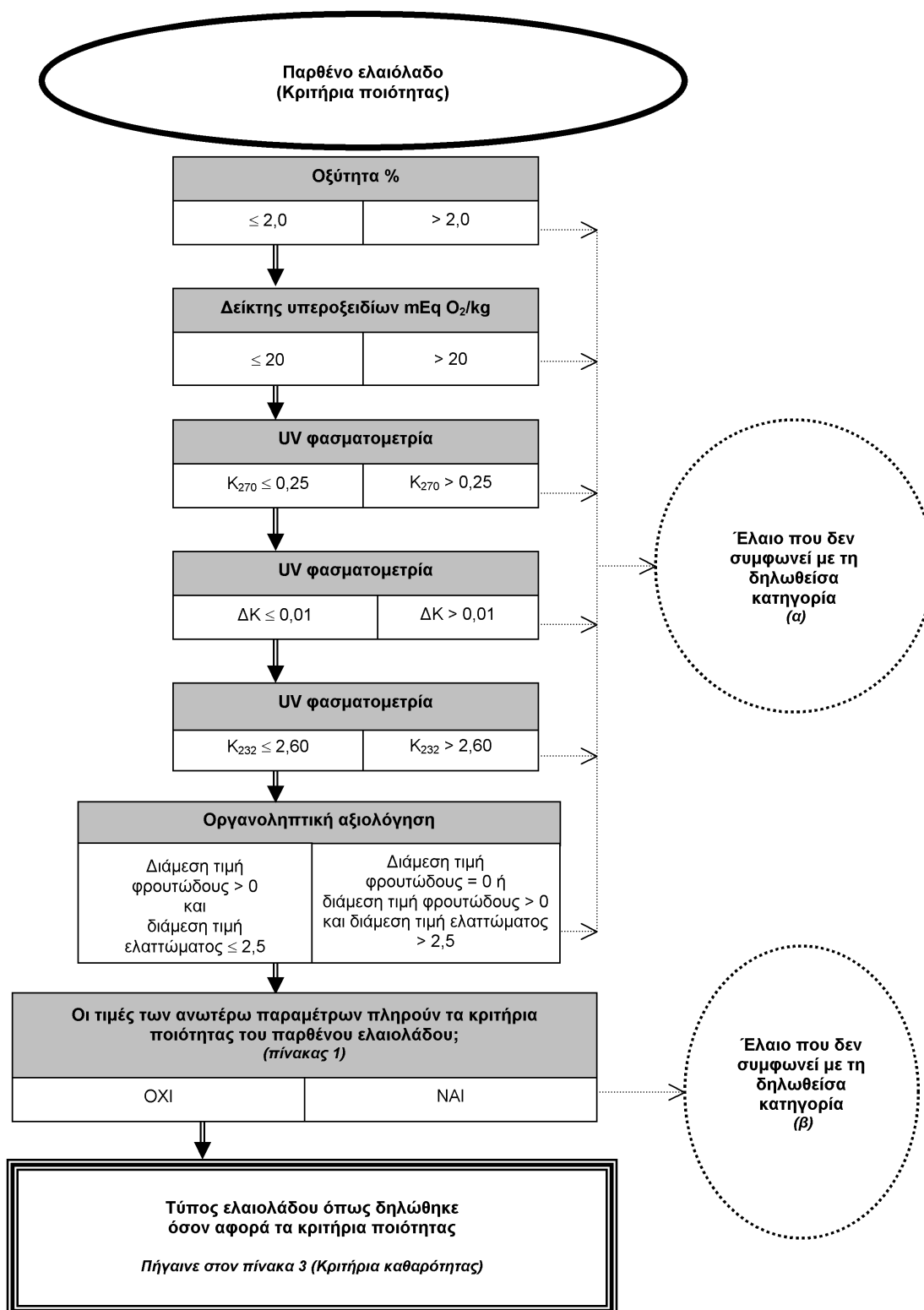
▼ **M20**

Πίνακας 1



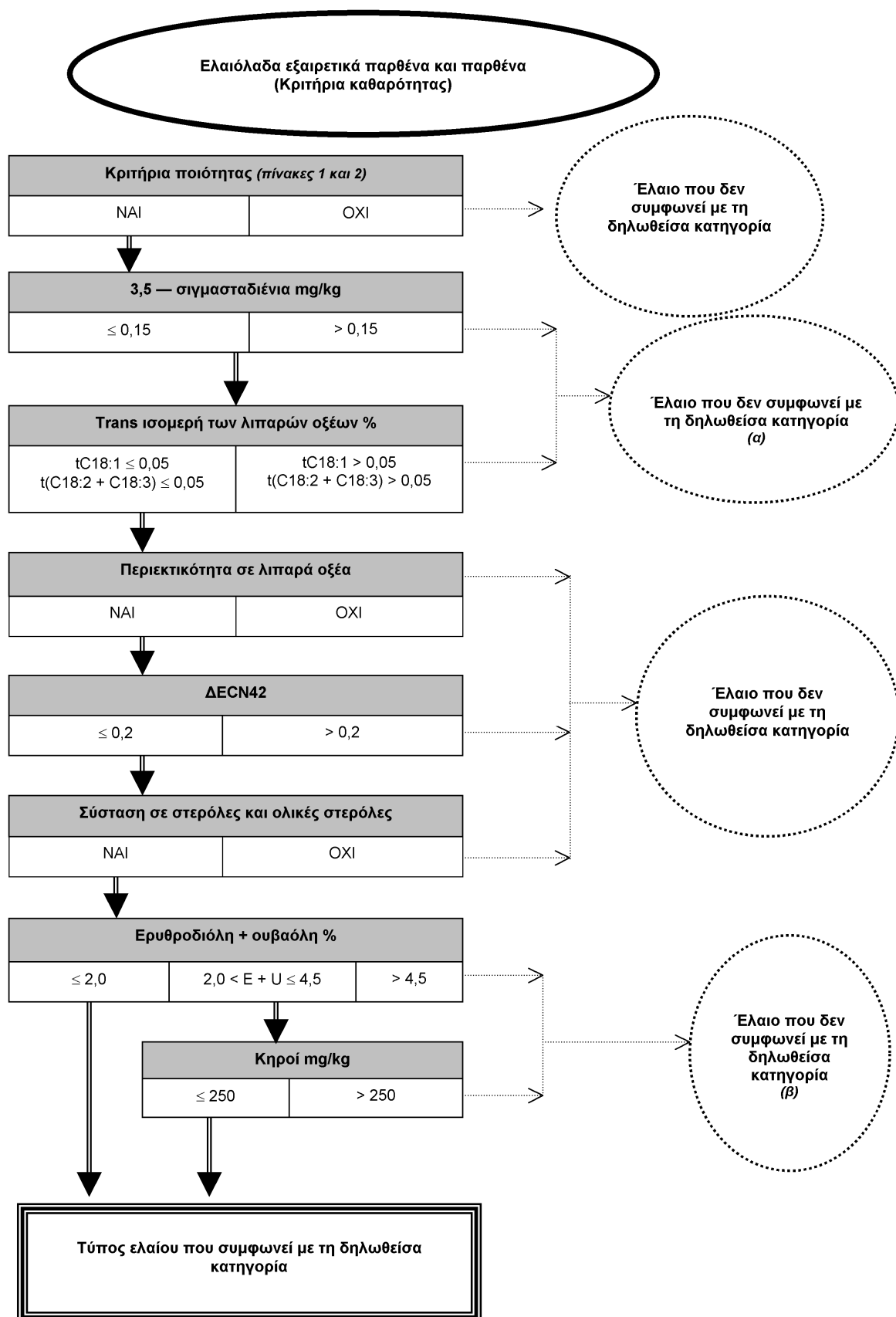
▼ **M20**

Πίνακας 2



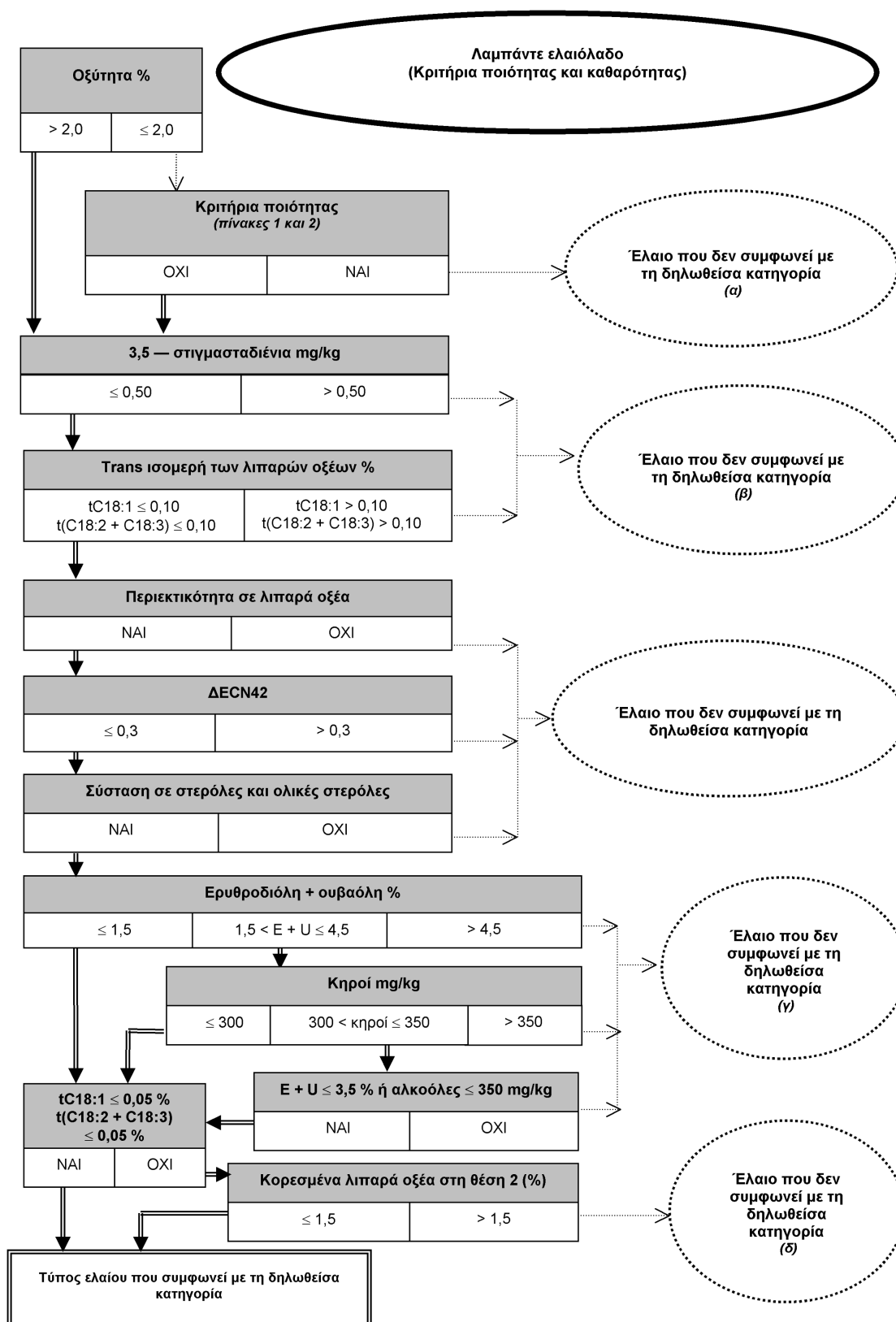
▼ **M20**

Πίνακας 3



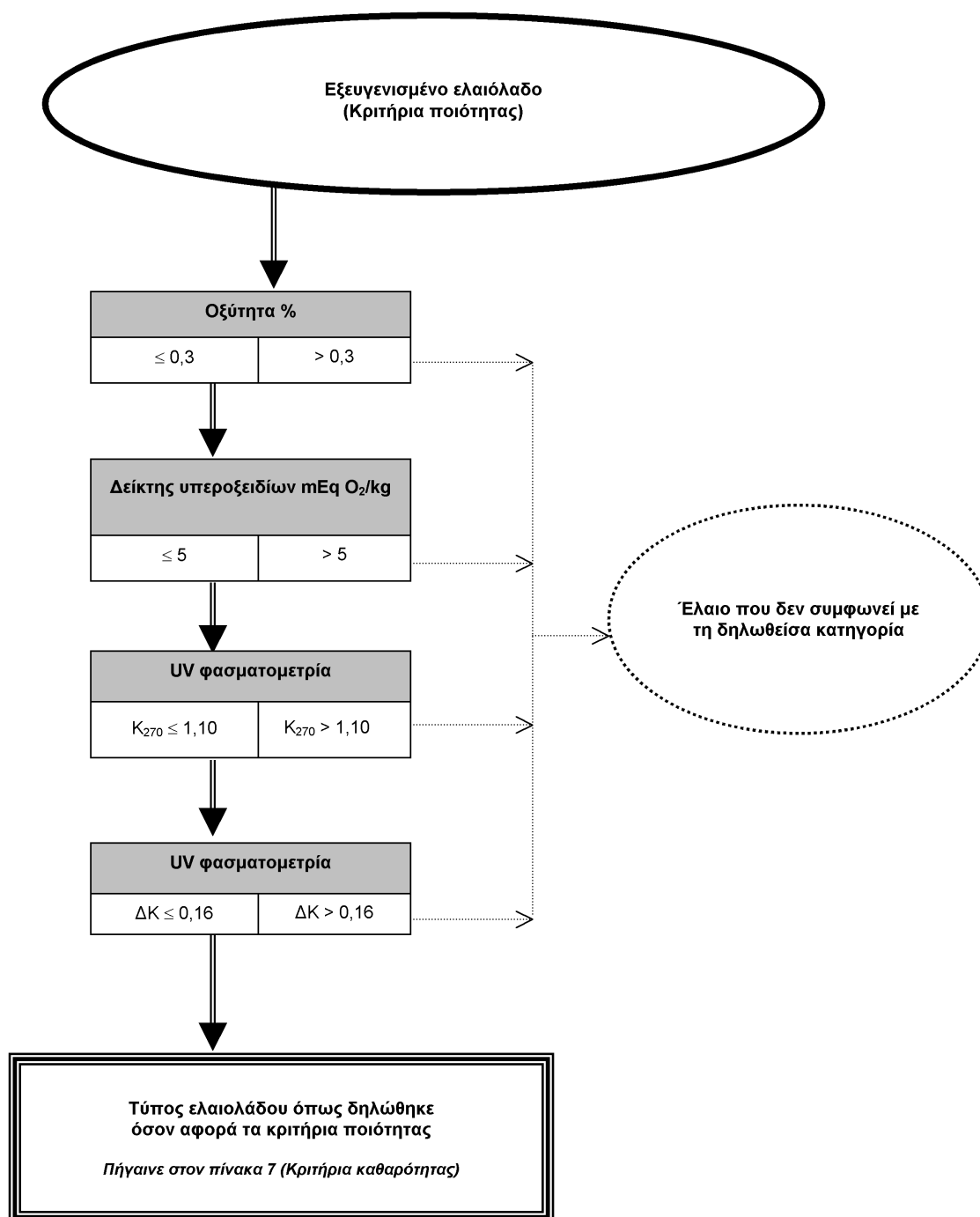
▼ M20

Πίνακας 4



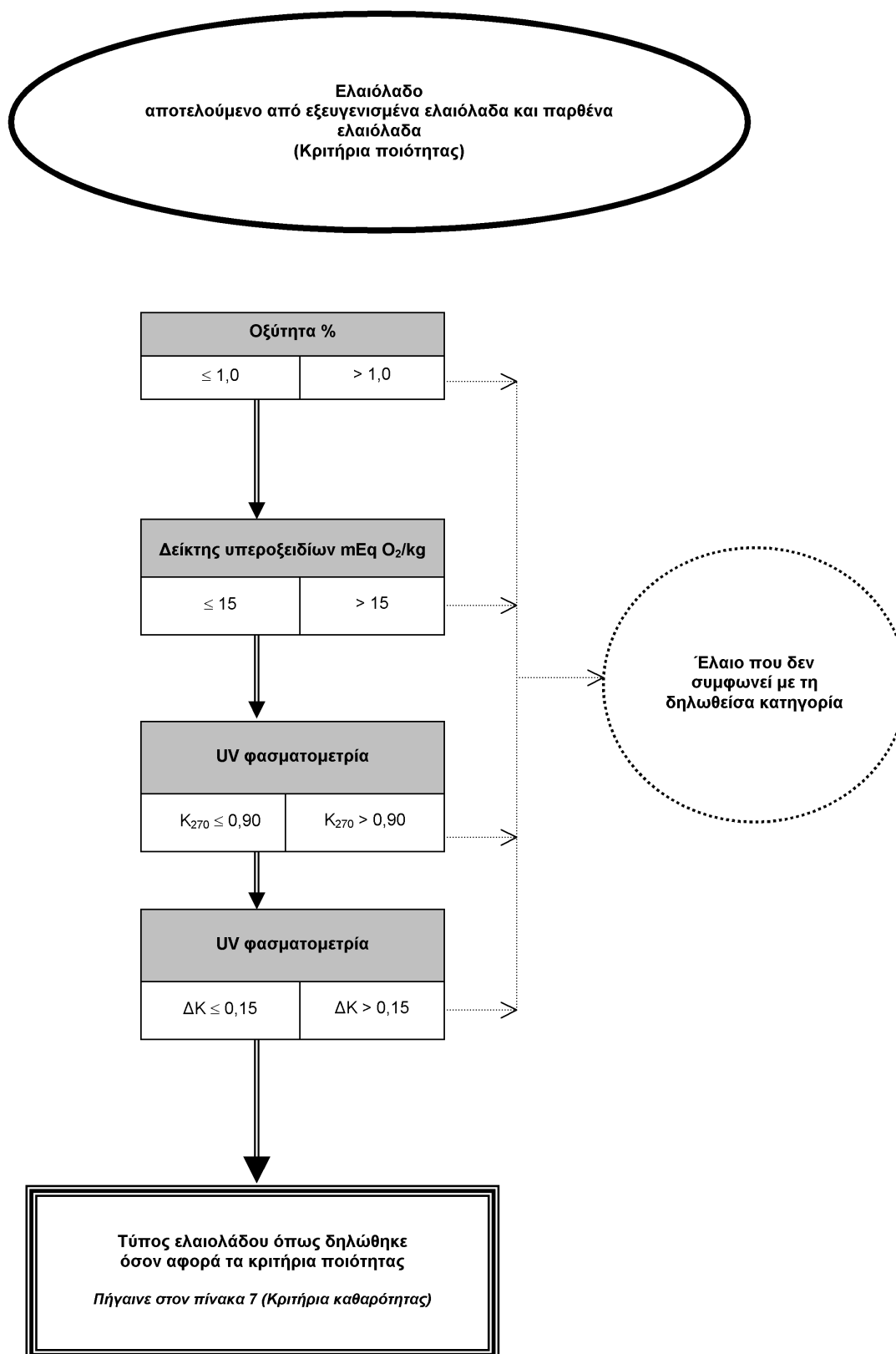
▼ **M20**

Πίνακας 5



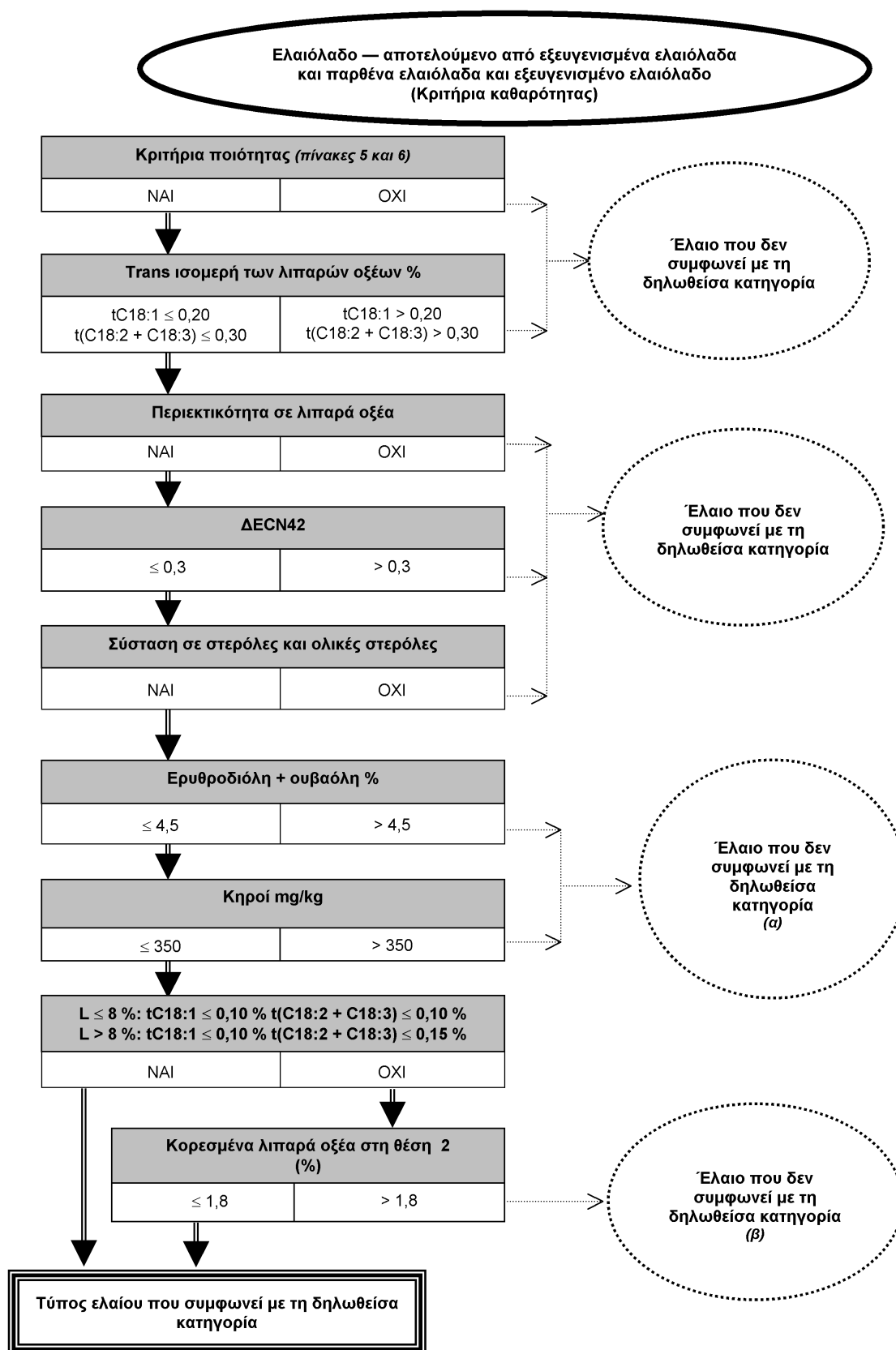
▼ **M20**

Πίνακας 6



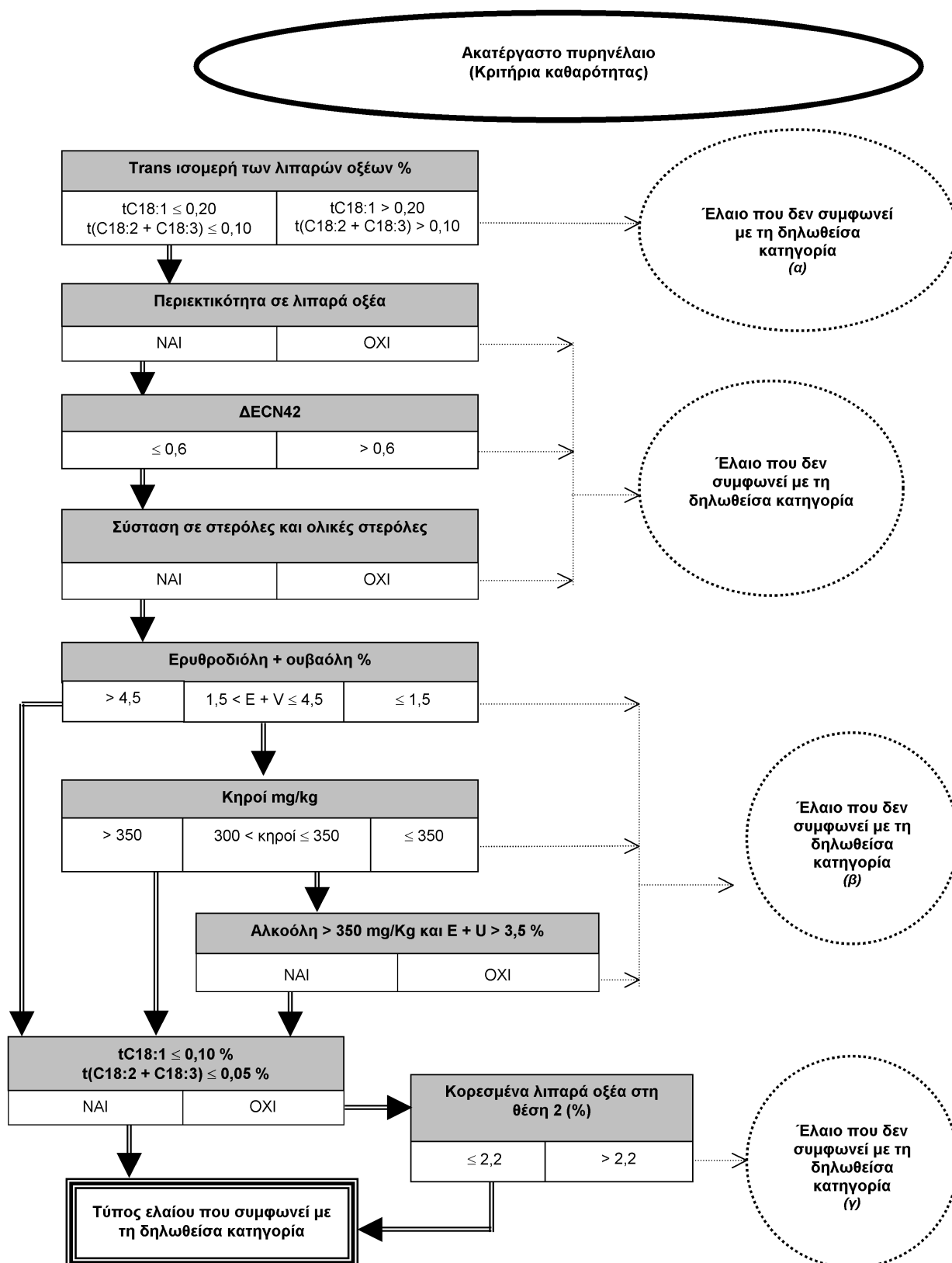
▼ M20

Πίνακας 7



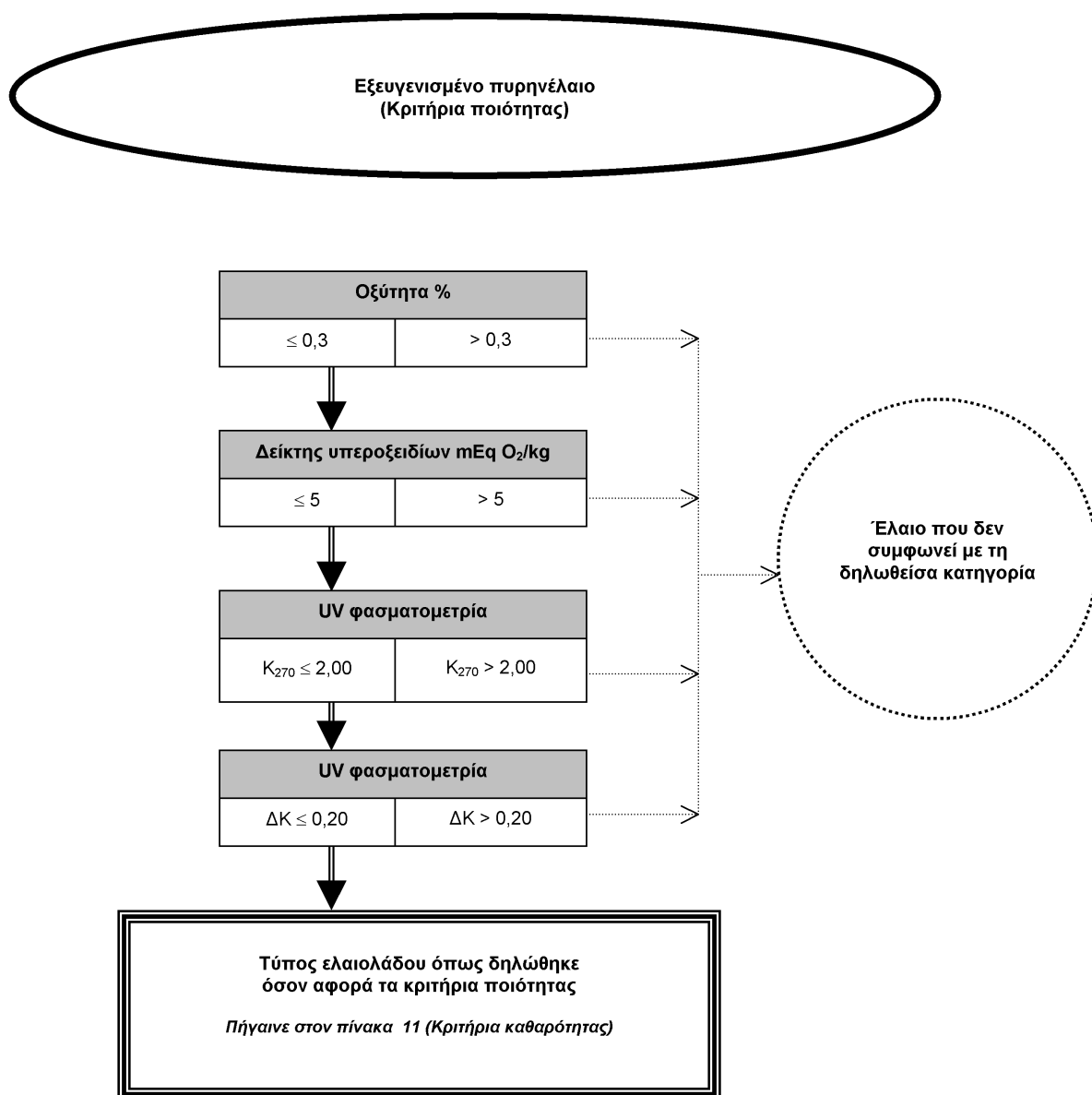
▼ M20

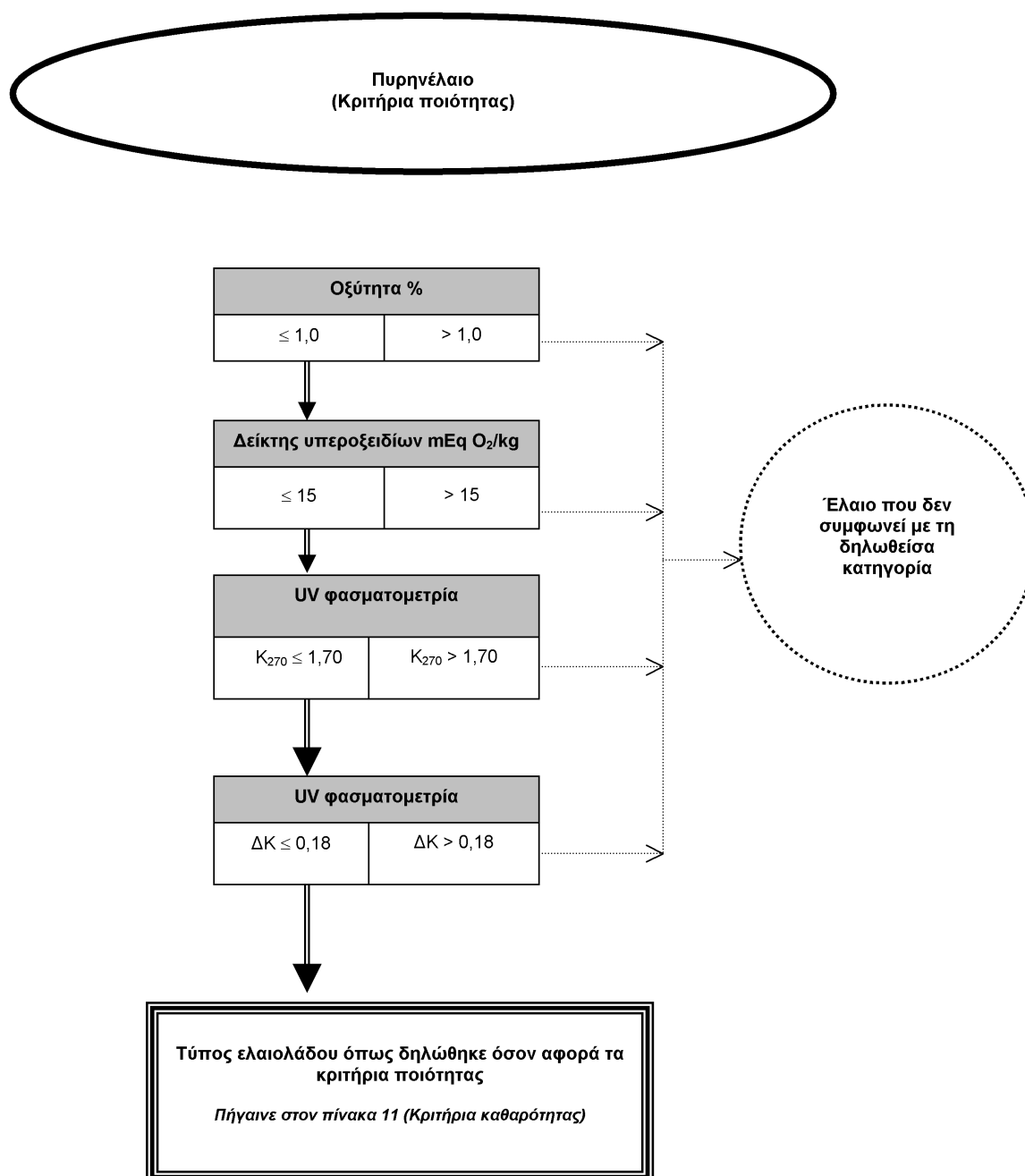
Πίνακας 8



▼ **M20**

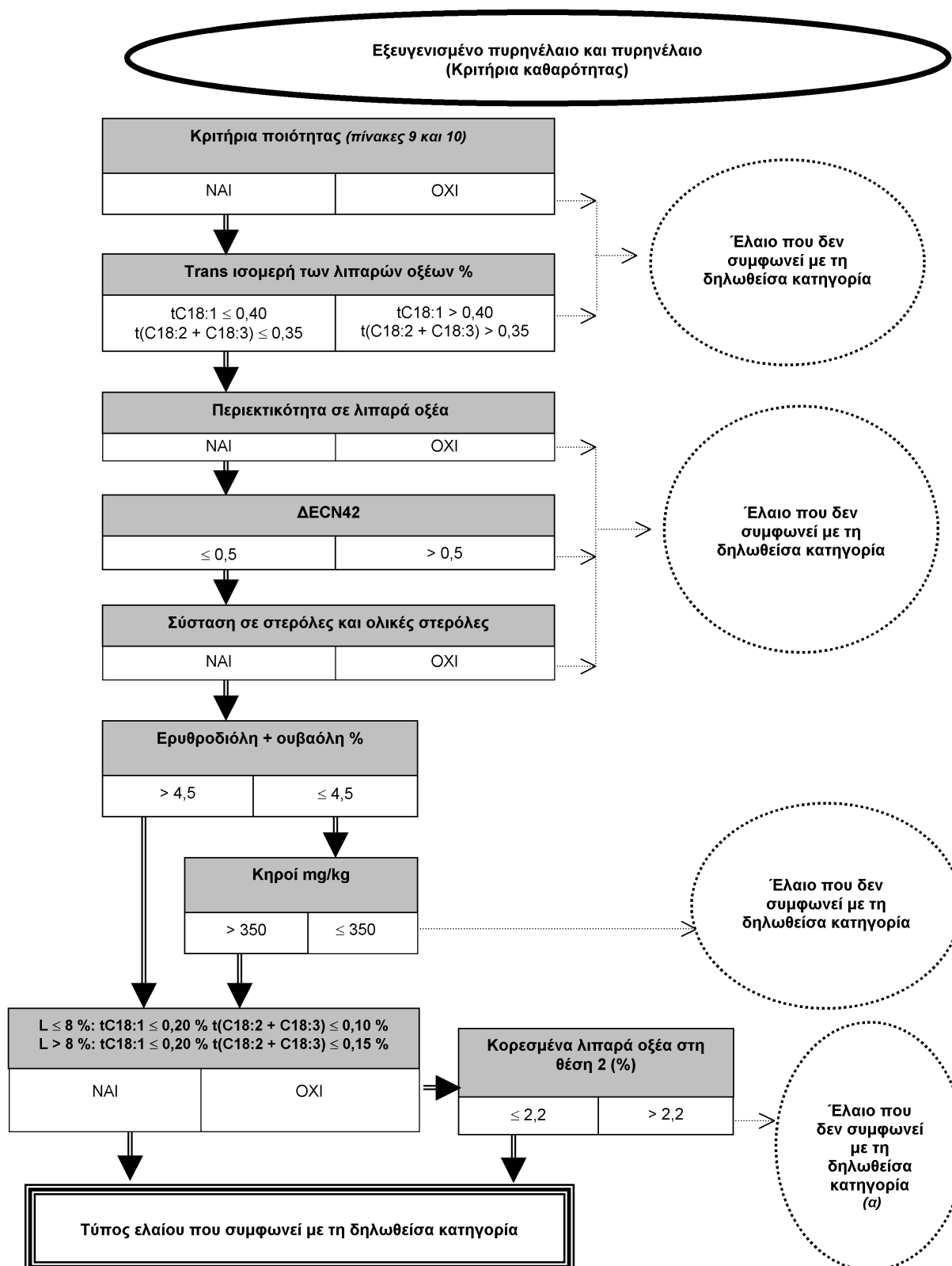
Πίνακας 9



▼ **M20****Πίνακας 10**

▼ **M20**

Πίνακας 11



▼ **M20***Προσάρτημα 1*

Αντιστοιχία μεταξύ των παραρτημάτων του παρόντος κανονισμού και των αναλύσεων που αναφέρονται στο δένδροδιάγραμμα αποφάσεων

▼ **M21**

— Οξύτητα	Παράρτημα II	Προσδιορισμός των ελευθέρων λιπαρών οξέων, εν ψυχρώ μέθοδος
-----------	--------------	---

▼ **M20**

— Δείκτης υπεροξειδίων	Παράρτημα III	Προσδιορισμός του δείκτη υπεροξειδίου
— Φασματοφωτομετρία με υπεριώδεις	Παράρτημα IX	Φασματοφωτομετρική ανάλυση
— Οργανοληπτική αξιολόγηση	Παράρτημα XII	Οργανοληπτική αξιολόγηση του παρθένου ελαιολάδου
— 3,5 στιγμασταδιένια	Παράρτημα XVII	Μέθοδος προσδιορισμού των στιγμασταδιενίων στα φυτικά έλαια
— Trans ισομερή των λιπαρών οξέων	Παράρτημα Xα και	Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων
	Παράρτημα Xβ	Παρασκεύασμα μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων
— Σύσταση σε λιπαρά οξέα	Παράρτημα Xα και	Μέθοδος για την παρασκευή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων
	Παράρτημα Xβ	Παρασκεύασμα μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων
— ΔECN42	Παράρτημα XVIII	Προσδιορισμός της συστάσεως των τριγλυκεριδίων σε ECN42 (διαφορά μεταξύ της πραγματικής συστάσεως και θεωρητικής συστάσεως)
— Σύσταση σε στερόλες και ολικές στερόλες	Παράρτημα V	Προσδιορισμός της συστάσεως και του περιεχομένου σε στερόλες μέσω αέριας χρωματογραφίας με τριχοειδή στήλη
— Ερυθροδιόλη και ουβαόλη	Παράρτημα VI	Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ερυθροδιόλη και ουβαόλη
— Κηροί	Παράρτημα IV	Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε κηρούς με αέρια χρωματογραφία με τριχοειδή στήλη
— Αλειφατικές αλκοόλες	Παράρτημα XIX	Προσδιορισμός του περιεχομένου σε αλειφατικές αλκοόλες με αέρια χρωματογραφία με τριχοειδή στήλη

▼ **M21**

— Κορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2	Παράρτημα VII	Προσδιορισμός της εκατοστιαίας αναλογίας 2-μονοπαλμιτίνης
------------------------------------	---------------	---

▼ M20*Προσάρτημα 2***Πίνακας 1**

- α) Βλέπε παρθένο ή λαμπάντε ελαιόλαδο (κριτήρια ποιότητας *πίνακας 2*, ή κριτήρια ποιότητας και καθαρότητας, *πίνακας 4*)
- β) Βλέπε λαμπάντε ελαιόλαδο (κριτήρια ποιότητας και καθαρότητας, *πίνακας 4*)

Πίνακας 2

- α) Βλέπε λαμπάντε ελαιόλαδο (κριτήρια ποιότητας και καθαρότητας, *πίνακας 4*)
- β) Βλέπε εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (κριτήρια ποιότητας, *πίνακας 1*)

Πίνακας 3

- α) Παρουσία εξευγενισμένου ελαίου (ελιάς ή άλλα)
- β) Παρουσία πυρηνελαίου

Πίνακας 4

- α) Βλέπε εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και παρθένο ελαιόλαδο (κριτήρια ποιότητας *πίνακες 1 και 2*)
- β) Παρουσία εξευγενισμένου ελαίου (ελιάς ή άλλα)
- γ) Παρουσία πυρηνελαίου
- δ) Παρουσία εστεροποιημένων ελαίων

Πίνακας 7

- α) Παρουσία πυρηνελαίου
- β) Παρουσία εστεροποιημένων ελαίων

Πίνακας 8

- α) Παρουσία εξευγενισμένου ελαίου (ελιάς ή άλλα)
- β) (Βλέπε λαμπάντε ελαιόλαδα (κριτήρια ποιότητας και καθαρότητας, *πίνακας 4*)
- γ) Παρουσία εστεροποιημένων ελαίων

Πίνακας 11

- α) Παρουσία εστεροποιημένων ελαίων

▼B**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II****▼M21****ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ, ΕΝ ΨΥΧΡΩ ΜΕΘΟΔΟΣ****▼B****1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ**

Ο προσδιορισμός ελεύθερων λιπαρών οξέων σε ελαιόλαδα. Η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα εκφράζεται ως οξύτητα υπολογισθείσα με συμβατικό τρόπο.

1.1. Αρχή

Διαλύεται το δείγμα σε μείγμα διαλυτών και τα περιεχόμενα ελεύθερα λιπαρά οξέα ογκομετρούνται χρησιμοποιώντας διάλυμα υδροξειδίου του καλίου σε αιθανόλη.

1.2. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας και το χρησιμοποιούμενο νερό να είναι απεσταγμένο ή ισοδύναμης καθαρότητας.

1.2.1. Μείγμα διαθυλαιθέρος αιθανόλης 95 % [με αναλογία 1:1 (V/V)].

Προσοχή: Ο διαθυλαιθέρας είναι εξαιρετικά εύφλεκτος και μπορεί να σχηματίσει εκρηκτικά υπεροξείδια. Πρέπει να λαμβάνεται ειδική μέριμνα κατά τη χρήση του.

Εξουδετερώνεται ακριβώς τη στιγμή χρησιμοποίησής του με το διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (1.2.2), με την προσθήκη 0,3 ml διαλύματος φαινολφθαλεΐνης (1.2.3) ανά 100 ml μείγματος.

Σημείωση: Εάν δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί διαθυλαιθέρας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μείγμα διαλυτών που περιέχει αιθανόλη και τολουόλιο. Εάν χρειαστεί, η αιθανόλη μπορεί να αντικατασταθεί από 2-προπανόλη.

1.2.2. Πρότυπο διάλυμα υδροξειδίου του καλίου σε αιθανόλη, κανονικότητας περίπου 0,1 mol/l ή, εάν χρειαστεί, περίπου 0,5 mol/l.

Η ακριβής συγκέντρωση του αιθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου πρέπει να είναι γνωστή και να έχει ελεγχθεί ακριβώς πριν χρησιμοποιηθεί. Χρησιμοποιείται διάλυμα παρασκευασμένο τουλάχιστον πέντε ημέρες πριν από τη χρήση και αποθηκευμένο σε σκούρα (καστανή) γυάλινη φιάλη με ελαστικό πώμα. Το διάλυμα πρέπει να είναι άχρωμο ή χρώματος αμυδρώς κίτρινου.

Σημείωση: Ένα σταθερό άχρωμο διάλυμα υδροξειδίου του καλίου μπορεί να παρασκευαστεί ως εξής: Φέρονται σε βρασμό 1 000 ml αιθανόλης με 8 g υδροξειδίου του καλίου και 0,5 g ρινισμάτων αργιλίου και συνεχίζεται επί μία ώρα ο βρασμός με κάθετο ψυκτήρα. Εκτελείται αμέσως διήθηση. Διαλύεται μέσα στο διήθημα η απαιτούμενη ποσότητα υδροξειδίου του καλίου. Αφήνονται επί αρκετές ημέρες και το διαυγές υπερκείμενο υγρό διαχωρίζεται με έκχυση από το ίζημα ανθρακικού καλίου.

Το διάλυμα μπορεί επίσης να παρασκευαστεί χωρίς διήθηση ως εξής: Σε 1 000 ml αιθανόλης προστίθενται 4 ml βουτυλικού αργιλίου και το μείγμα αφήνεται επί αρκετές ημέρες. Το υπερκείμενο υγρό εκχύεται και διαλύεται η απαιτούμενη ποσότητα υδροξειδίου του καλίου. Το διάλυμα είναι έτοιμο προς χρήση.

1.2.3. Φαινολφθαλεΐνη, διάλυμα 10 g/l σε αιθανόλη 95-96 (V/V) ή κυανού της βρωμοφαινόλης (στην περίπτωση λιπών με έντονο χρώμα), διάλυμα 20 g/l σε αιθανόλη 95-96 (V/V).**1.3. Όργανα**

Συνήθισμένοι εργαστηριακός εξοπλισμός, περιλαμβάνοντας:

▼B

1.3.1. Αναλυτικό ζυγό.

1.3.2. Κωνική φιάλη των 250 ml.

1.3.3. Προχοΐδα των 10 ml, βαθμονομημένη ανά 0,05 ml.

1.4. Διαδικασία

1.4.1. Παρασκευή δείγματος προς ανάλυση

Ο προσδιορισμός πραγματοποιείται επί του διηθημένου δείγματος, εάν η συνολική περιεκτικότητα σε υγρασία και ξένες προσμείξεις είναι μικρότερη από 1 %, ο προσδιορισμός πραγματοποιείται επί του δείγματος όπως έχει.

1.4.2. Ποσότης του δείγματος δοκιμής

Η ποσότης του δείγματος δοκιμής είναι ανάλογη με την αναμενόμενη οξύτητα, σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα.

Αναμενόμενος δείκτης οξύτητας	Μάζα δείγματος δοκιμής	Ακρίβεια ζύγισης δείγματος δοκιμής
< 1	20	0,05
1 μέχρι 4	10	0,02
4 μέχρι 15	2,5	0,01
15 μέχρι 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Το δείγμα δοκιμής ζυγίζεται στην κωνική φιάλη (4.3.2).

1.4.3. Προσδιορισμός

Το δείγμα δοκιμής (1.4.2) διαλύεται σε 50 ως 150 ml του προηγούμενα εξουδετερωμένου μείγματος διαιθυλαιθέρος και αιθανόλης (1.2.1).

Ογκομετρείται με ταυτόχρονη ανάδευση με το διάλυμα 0,1 mol υδροξειδίου του καλίου (1.2.2) (βλέπε σημείωση 2) έως ότου αλλάξει χρώμα ο δείκτης (το ρόδινο χρώμα της φαινοolphθαλεΐνης επικρατεί επί τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα).

Σημειώσεις: 1. Το τιτλοδοτημένο αιθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (1.2.2) δύναται να αντικατασταθεί από ένα υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου ή του νατρίου, εφόσον ο όγκος του εισαχθέντος ύδατος δεν επιφέρει διαχωρισμό των φάσεων.

2. Εάν η απαραίτητη ποσότητα διαλύματος του υδροξειδίου του καλίου 0,1 mol/l υπερβαίνει τα 10 ml, χρησιμοποιείται ένα διάλυμα 0,5 mol/l.

3. Εάν το διάλυμα θολώνει κατά την ογκομέτρηση, προστίθεται μια ικανοποιητική ποσότητα μείγματος διαλυτών προκειμένου να επιτευχθεί ένα διαυγές διάλυμα.

1.5. Έκφραση της οξύτητας επί τοις % συγκέντρωσης ελαϊκού οξέος

Η οξύτητα, εκφρασμένη σε κατά βάρος εκατοστιαία αναλογία, ισούται με:

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

▼B

όπου:

- V είναι ο όγκος σε χιλιοστόλιτρα, του τιτλοδοτημένου διαλύματος υδροξειδίου του καλίου που έχει χρησιμοποιηθεί,
- c είναι η ακριβής συγκέντρωση, σε moles ανά λίτρο, του τιτλοδοτημένου διαλύματος υδροξειδίου του καλίου που έχει χρησιμοποιηθεί,
- M είναι το γραμμομοριακό βάρος, σε γραμμάρια ανά mole, του οξέος που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση του αποτελέσματος (= 282),
- m είναι το βάρος, σε γραμμάρια, του δείγματος δοκιμής.

Ως αποτέλεσμα λαμβάνεται ο αριθμητικός μέσος όρος ► **M6** δύο προσδιορισμών ◀.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΩΝ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Η προδιαγραφή αυτή περιγράφει μια μέθοδο προσδιορισμού του αριθμού των υπεροξειδίων ελαίων και λιπών.

2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

►C1 Η μέθοδος ◄ αυτή είναι εφαρμόσιμη σε ζωικά και φυτικά έλαια και λίπη.

3. ΟΡΙΣΜΟΣ

Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφράζει την ποσότητα αυτών των συστατικών του δείγματος (εκφρασμένη σε χιλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά kg) που οξειδώνουν το ιωδιούχο κάλιο κάτω από τις περιγραφόμενες συνθήκες αναλύσεις.

4. ΑΡΧΗ

Το ληφθέν δείγμα διαλύεται σε μείγμα οξικού οξέος και χλωροφόρμιου και προστίθεται διάλυμα ιωδιούχου καλίου. Ογκομέτρηση του απελευθερούμενου ιωδίου με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου.

5. ΟΡΓΑΝΑ

Όλος ο χρησιμοποιούμενος εξοπλισμός πρέπει να είναι απαλλαγμένος αναγωγικών ή οξειδωτικών ουσιών.

Σημείωση: Να μην λιπαίνονται οι εσφυρισμένες επιφάνειες.

5.1. Γυάλινο κουτάλι των 3 ml.

5.2. Εσφυρισμένες φιάλες με πόματα, χωρητικότητας περίπου 250 ml, οι οποίες προηγουμένως έχουν ξηρανθεί και στις οποίες έχει διαβιβάσθει αδρανές αέριο (άζωτο ή, προτιμότερα, διοξείδιο του άνθρακα).

5.3. Προχοΐδα των 25 ή 50 ml, βαθμολογημένη ανά 0,1 ml.

6. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

6.1. Χλωροφόρμιο, αναλυτικής καθαρότητας, απαλλαγμένο οξυγόνου με διοχέτευση υπό πίεση, μέσα από αυτό, ρεύματος καθαρού, ξηρού αδρανούς αερίου.

6.2. Κρυσταλλικό οξικό οξύ, αναλυτικής καθαρότητας, απαλλαγμένο οξυγόνου με διοχέτευση, υπό πίεση, μέσα από αυτό, καθαρού, ξηρού αερίου.

6.3. Κεκορεσμένο υδατικό διάλυμα KI προσφάτως παρασκευασθέν, απαλλαγμένο από ιώδιο και ιωδικά.

6.4. Πρότυπο διάλυμα ►C1 θειοθειικού ◄ νατρίου 0,01 ή 0,002 N, τιτλοδοτημένο μόλις πριν χρησιμοποιηθεί.

6.5. Υδατικό διάλυμα αμύλου 10 g/l, πρόσφατα παρασκευασμένο από φυσικό διαλυτό άμυλο.

7. ΔΕΙΓΜΑ

Να ληφθεί μέριμνα για την παραλαβή και διατήρηση του δείγματος μακριά από φώς, θερμότητα και σε εντελώς γεμάτα γυάλινα δοχεία, ερμητικά σφραγισμένα με πόματα, από αδιαφανές γυαλί ή φελλό.

▼B**8. ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΣ**

Η ανάλυση πρέπει να γίνεται με διάχυτο φυσικό ή με τεχνητό φωτισμό. Ζυγίζεται σε γυάλινο κουτάλι (5.1) ή εάν αυτό δεν υπάρχει, σε φιάλη (5.2) με ακρίβεια 0,001 g, ποσότης του δείγματος σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα, ανάλογα με τον αναμενόμενο αριθμό υπεροξειδίων.

Αναμενόμενος αριθμός υπεροξειδίων (mEq)	Βάρος δείγματος σε gr (g)
0-12	5,0-2,0
12-20	2,0-1,2
20-30	1,2-0,8
30-50	0,8-0,5
50-90	0,5-0,3

Αποποματίζεται μία φιάλη (5.2) και εισάγεται το γυάλινο κουτάλι που περιέχει τη ζυγισθείσα ποσότητα του δείγματος. Προστίθενται 10 ml χλωροφόρμιου (6.1). Διαλύεται το δείγμα γρήγορα με ανάδευση. Προστίθενται 15 ml οξικού οξέος (6.2), κατόπιν 1 ml διαλύματος ιωδιούχου καλίου (6.3). Πωματίζεται γρήγορα, γίνεται ανάδευση επί ένα λεπτό, και αφήνεται για 5 λεπτά ακριβώς, μακριά από το φώς σε θερμοκρασία 15 έως 25 °C.

Προστίθενται περίπου 75 ml απεσταγμένου νερού. Το απελευθερούμενο ιώδιο ογκομετρείται με το διάλυμα του θειοθειικού νατρίου (6.4) (διάλυμα 0,002 N για αναμενόμενες τιμές μικρότερες από 12, και διάλυμα 0,01 N για αναμενόμενες τιμές πάνω από 12) με ζωηρή ανάδευση, χρησιμοποιώντας διάλυμα αμύλου (6.5) σαν δείκτη.

Εκτελούνται δύο ποσδιορισμοί στο ίδιο δοκιμαστικό δείγμα.

Εκτελείται ταυτόχρονα λευκός προσδιορισμός (τυφλός). Εάν το αποτέλεσμα του τυφλού ξεπερνά τα 0,05 ml διαλύματος 0,01 N θειοθειικού νατρίου (6.4), αντικαθίστανται τα αντιδραστήρια.

9. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο αριθμός υπεροξειδίων (AY), εκπεφρασμένος σε χιλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά kg, δίνεται από τη σχέση:

$$AY = \frac{V \times T \times 1000}{m}$$

όπου

V είναι ο αριθμός των ml του προτύπου διαλύματος θειοθειικού νατρίου (6.4) χρησιμοποιούμενου για την ογκομέτρηση, μετά την αφαίρεση του λευκού,

T είναι η ακριβής κανονικότητα του διαλύματος θειοθειικού νατρίου (6.4) που χρησιμοποιείται,

m είναι το βάρος του δείγματος σε g.

Σαν αποτέλεσμα λαμβάνεται ο αριθμητικός μέσος των δύο εκτελεσθέντων προσδιορισμών.

▼ M21

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΚΗΡΟΥΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗΛΗΣ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Στην παρούσα μέθοδο περιγράφεται διαδικασία προσδιορισμού της περιεκτικότητας των ελαιολάδων σε κηρούς. Οι κηροί διαχωρίζονται ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί κυρίως για τη διάκριση μεταξύ του ελαιολάδου που λαμβάνεται με έκθλιψη και εκείνου που λαμβάνεται με εκχύλιση (πυρηνέλαιο).

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προστίθεται στη λιπαρή ουσία κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο και ακολουθεί διαχωρισμός με χρωματογραφία σε στήλη ένυδρου διοξειδίου του πυριτίου (silica gel). Παραλαμβάνεται το πρώτο κλάσμα που εκλούεται στις συνθήκες της δοκιμής (με πολικότητα μικρότερη εκείνης των τριγλυκεριδίων) και υποβάλλεται σε άμεση ανάλυση με αέρια χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- 3.1. Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) των 25 ml.
- 3.2. Γυάλινη στήλη για αέρια χρωματογραφία, εσωτερικής διαμέτρου 15,0 mm και ύψους 30-40 cm, εφοδιασμένη με στρόφιγγα.
- 3.3. Αεριοχρωματογράφος δυνάμενος να λειτουργεί με τριχοειδή στήλη, εφοδιασμένος με σύστημα απευθείας εισαγωγής του δείγματος στη στήλη και αποτελούμενος από:
 - 3.3.1. Θερμοστατούμενο θάλαμο στηλών, εξοπλισμένο με προγραμματιστή θερμοκρασίας.
 - 3.3.2. Σύστημα έγχυσης εν ψυχρώ για απευθείας εισαγωγή στη στήλη.
 - 3.3.3. Ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και μετατροπέα-ενισχυτή.
 - 3.3.4. Καταγραφέα-ολοκληρωτή δυνάμενος να λειτουργεί με τον μετατροπέα-ενισχυτή (3.3.3), με χρόνο απόκρισης που δεν υπερβαίνει το 1 δευτερόλεπτο και με μεταβλητή ταχύτητα χαρτιού. (Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν πληροφορικά συστήματα, στα οποία τα αεριοχρωματογραφικά δεδομένα λαμβάνονται με τη βοήθεια υπολογιστή.)
 - 3.3.5. Τριχοειδή στήλη από γυαλί ή τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, μήκους 8 έως 12 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, επικαλυμμένη εσωτερικά με υγρή φάση, ομοιόμορφου πάχους 0,10 έως 0,30 μm (Κατάλληλη υγρή φάση του εμπορίου, τύπου SE 52 ή SE 54.)
- 3.4. Μικροσύριγγα των 10 μl για την απευθείας εισαγωγή στη στήλη, με συγκολλημένη στο σώμα της βελόνα.
- 3.5. Ηλεκτρικός δονητής.
- 3.6. Περιστροφικός εξατμιστήρας.
- 3.7. Ηλεκτρικός κλίβανος.
- 3.8. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ζύγισης $\pm 0,1 \text{ mg}$.
- 3.9. Συνήθη εργαστηριακά γυάλινα σκεύη.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 4.1. Διοξείδιο του πυριτίου (silica gel) κοκκομετρικού βαθμού 60 έως 200 μm

Η silica gel πρέπει να τοποθετείται στον κλίβανο σε θερμοκρασία 500 °C επί 4 ώρες τουλάχιστον. Αφού ψυχθεί, προστίθεται νερό σε αναλογία 2 % της ληφθείσας ποσότητας silica gel. Το μείγμα αναδεύεται κατάλληλα, ώστε να ομοιογενοποιηθεί και φυλάσσεται στο σκοτάδι επί 12 τουλάχιστον ώρες πριν χρησιμοποιηθεί.

▼ **M21**

- 4.2. n-εξάνιο για χρωματογραφία.
- 4.3. Αιθυλαιθέρας για χρωματογραφία.
- 4.4. n-επτάνιο για χρωματογραφία.
- 4.5. Πρότυπο διάλυμα λαυρικού αραχιδεστέρα 0,1 % (m/V) σε εξάνιο (εσωτερικό πρότυπο) (Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί παλμιτικός παλμιτεστέρας ή μυριστικός στεατεστέρας.)
- 4.5.1. *Χρωστική Sudan 1 (1-φαινυλ-αζω-2-ναφθόλη)*
- 4.6. Φέρον αέριο: καθαρό υδρογόνο ή ήλιο, για αέρια χρωματογραφία
- 4.7. Βοηθητικά αέρια:
 - καθαρό υδρογόνο για αέρια χρωματογραφία,
 - καθαρός αέρας, για αέρια χρωματογραφία.

5. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

5.1. **Ετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης**

Σχηματίζεται εναιώρημα 15 g silica gel (4.1) σε n-εξάνιο (4.2) και εισάγεται στη στήλη (3.2). Αφήνεται να κατακαθίσει. Η αυτόματη καθίζηση συμπληρώνεται με τη βοήθεια ηλεκτρικού αναδευτήρα (3.5), ώστε η χρωματογραφική στήλη να γίνει πιο ομοιογενής. Διηθούνται μέσω της στήλης 30 ml n-εξανίου για να απομακρυνθούν οι ενδεχόμενες ξένες προσμείξεις. Ζυγίζονται με ακρίβεια στον αναλυτικό ζυγό (3.8) 500 mg δείγματος μέσα στη φιάλη Erlenmeyer των 25 ml (3.1) και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα εσωτερικού προτύπου (4.5), ανάλογα με την εκτιμώμενη περιεκτικότητα σε κηρούς. Για παράδειγμα, προστίθεται 0,1 mg λαυρικού αραχιδεστέρα στην περίπτωση του ελαιολάδου και 0,25 έως 0,50 mg στην περίπτωση του πυρηνελαίου. Το παρασκευαζόμενο με τον τρόπο αυτό δείγμα φέρεται στη χρωματογραφική στήλη με τη βοήθεια δύο ποσοτήτων n-εξανίου (4.2) των 2 ml.

Αφήνεται ο διαλύτης να εκρεύσει μέχρι ύψους 1 mm πάνω από το προσροφητικό και, κατόπιν, διηθούνται μέσω της στήλης 70 ml n-εξανίου ακόμη, για να απομακρυνθούν τα φυσιολογικά ενυπάρχοντα n-αλκάνια. Αρχίζει τότε η χρωματογραφική έκλυση με συλλογή 180 ml μείγματος n-εξανίου και αιθυλαιθέρα 99:1, ενώ η ταχύτητα ροής διατηρείται σε 15 σταγόνες περίπου ανά 10 δευτερόλεπτα. Το δείγμα πρέπει να εκλύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 22 ± 4 °C.

Σημειώσεις: — Το μείγμα n-εξανίου και αιθυλαιθέρα (99:1) πρέπει να παρασκευάζεται καθημερινά.

- Για τον οπτικό έλεγχο της ορθής έκλυσης των κηρών, είναι δυνατόν να προστεθούν στο διάλυμα του δείγματος 100 μl διαλύματος Sudan 1 % σε μείγμα έκλυσης. Επειδή ο χρόνος κατακράτησης της χρωστικής αυτής έχει τιμή μεταξύ εκείνης των κηρών και των τριγλυκεριδίων, όταν το χρώμα φθάσει στον πυθμένα της χρωματογραφικής στήλης, η έκλυση πρέπει να διακοπεί, καθώς έχουν διέλθει όλοι οι κηροί.

Το λαμβανόμενο με τον τρόπο αυτό κλάσμα ξηραίνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα (3.6) μέχρι να απομακρυνθεί σχεδόν τελείως ο διαλύτης. Τα τελευταία 2 ml διαλύτη απομακρύνονται με τη διαβίβαση ελαφρού ρεύματος αζώτου και, στη συνέχεια, προστίθενται 2-4 ml n-επτανίου.

5.2. **Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία**5.2.1. *Προκαταρκτικές εργασίες*

Τοποθετείται η στήλη μέσα στον αεριοχρωματογράφο (3.3) με σύνδεση του άκρου εισόδου με το σύστημα απευθείας εισαγωγής (on-column) και του άκρου εξόδου με τον ανιχνευτή. Εκτελούνται οι γενικοί έλεγχοι της συσκευής αέριας χρωματογραφίας (συμπεριφορά των κυκλωμάτων των αερίων, απόδοση του ανιχνευτή και του συστήματος καταγραφής κ.λπ.).

▼ **M21**

Εάν η στήλη χρησιμοποιείται για πρώτη φορά, συνιστάται η ρύθμιση των συνθηκών της. Διαβιβάζεται ελαφρό ρεύμα αερίου μέσω της στήλης και, στη συνέχεια, τίθεται σε λειτουργία η συσκευή αέριας χρωματογραφίας. Θερμαίνεται σταδιακά μέχρι να επιτευχθεί θερμοκρασία 350 °C εντός 4 ωρών περίπου. Η θερμοκρασία αυτή διατηρείται επί 2 τουλάχιστον ώρες και, κατόπιν, ρυθμίζεται η συσκευή στις συνθήκες λειτουργίας (ρύθμιση της παροχής των αερίων, αφή της φλόγας, σύνδεση με τον ηλεκτρονικό καταγραφέα (3.3.4), ρύθμιση της θερμοκρασίας του θαλάμου στήλων και του ανιχνευτή κ.λπ.) και καταγράφεται το σήμα με ευαισθησία τουλάχιστον διπλάσια της προβλεπόμενης για την εκτέλεση της ανάλυσης. Η βασική γραμμή (baseline) πρέπει να είναι ευθεία, χωρίς κορυφές και απόκλιση.

Ευθύγραμμη αρνητική απόκλιση υποδηλώνει ατελείς συνδέσεις της στήλης, ενώ θετική απόκλιση υποδηλώνει ανεπαρκή ρύθμιση των συνθηκών της στήλης.

5.2.2. *Επιλογή των συνθηκών εργασίας*

Κατά κανόνα, πρέπει να τηρούνται οι ακόλουθες συνθήκες εργασίας:

— θερμοκρασία της στήλης:

	20 °C/ λεπτό		5 °C/ λεπτό		20 °C/ λεπτό	
Κατά την έναρξη 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— θερμοκρασία του ανιχνευτή: 350 °C,

— εγγεόμενη ποσότητα υλικού: 1 μl του n-επτανικού διαλύματος (2-4 ml),

— φέρον αέριο: ήλιο ή υδρογόνο με τη βέλτιστη γραμμική ταχύτητα για το επιλεγμένο αέριο (βλέπε προσάρτημα),

— ευαισθησία των οργάνων: κατάλληλη ώστε να πληρούνται οι κατωτέρω όροι.

Οι συνθήκες αυτές μπορούν να τροποποιούνται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της στήλης και του αεριοχρωματογράφου, ώστε να επιτυγχάνονται διαχωρισμός όλων των κηρών, ικανοποιητική διαχωριστική (διακριτική) ικανότητα για όλες τις κορυφές (βλέπε σχήμα) και χρόνος κατακράτησης 18 ± 3 λεπτών για το εσωτερικό πρότυπο με 32 άτομα άνθρακα (C₃₂). Η αντιπροσωπευτικότερη κορυφή των κηρών πρέπει να ισούται τουλάχιστον με το 60 % της κατώτερης τιμής της κλίμακας.

Οι παράμετροι ολοκλήρωσης των κορυφών πρέπει να καθορίζονται κατά τρόπο ώστε να υπολογίζονται σωστά τα εμβαδά των κορυφών που λαμβάνονται υπόψη.

Σημείωση: Λόγω της υψηλής τελικής θερμοκρασίας, γίνεται δεκτή θετική μετατόπιση, η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % της κατώτερης τιμής της κλίμακας.

5.3. **Εκτέλεση της ανάλυσης**

Λαμβάνεται 1 μl διαλύματος με τη μικροσύριγγα των 10 μl και αποσύρεται το έμβολο της σύριγγας, ώστε να αδειάσει η βελόνα. Εισάγεται η βελόνα στο σύστημα έγχυσης και μετά από 1 έως 2 δευτερόλεπτα εγχέεται το διάλυμα γρήγορα. Μετά από 5 δευτερόλεπτα περίπου, η βελόνα εξάγεται αργά.

Καταγράφονται οι ενδείξεις του οργάνου μέχρι την πλήρη έκλυση των κηρών.

▼ **M21**

Η βασική γραμμή πρέπει πάντοτε να ανταποκρίνεται στους απαιτούμενους όρους.

5.4. **Ταυτοποίηση των κορυφών**

Οι διάφορες κορυφές πρέπει να ταυτοποιούνται βάσει των χρόνων κατακράτησης και με σύγκριση με μείγματα κηρών γνωστών χρόνων κατακράτησης, που αναλύθηκαν στις ίδιες συνθήκες.

Το κατωτέρω σχήμα απεικονίζει χρωματογράφημα των κηρών παρθένου ελαιολάδου.

5.5. **Ποσοτικός προσδιορισμός**

Με τη βοήθεια του ολοκληρωτή υπολογίζονται τα εμβαδά των κορυφών που αντιστοιχούν στο εσωτερικό πρότυπο και στους αλειφατικούς εστέρες με 40 έως 46 άτομα άνθρακα (C₄₀ έως C₄₆).

Υπολογίζεται η περιεκτικότητα κάθε εστέρα σε κηρούς, σε mg/kg λιπαρής ουσίας, σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{εστέρας, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

όπου:

A_x = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί σε κάθε εστέρα, σε τετραγωνικά χιλιοστόμετρα,

A_s = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο, σε τετραγωνικά χιλιοστόμετρα,

m_s = η προστιθέμενη μάζα εσωτερικού προτύπου, σε χιλιοστόγραμμα,

m = η μάζα του λαμβανόμενου για τον προσδιορισμό δείγματος, σε γραμμάρια.

6. **ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

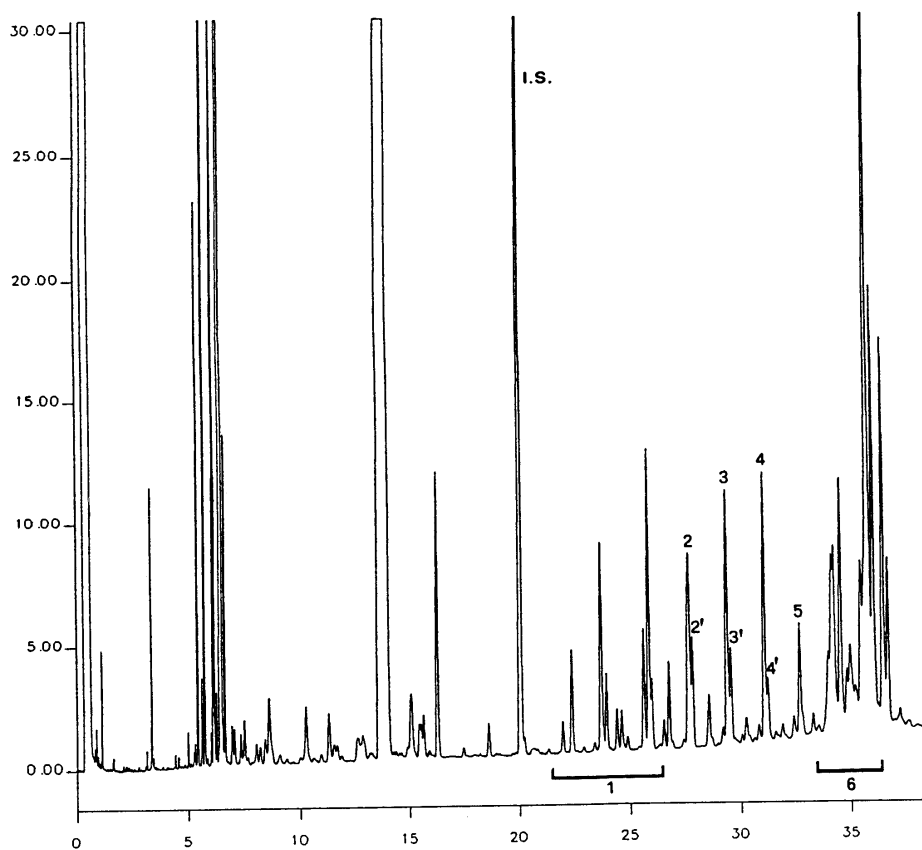
Αναφέρεται το άθροισμα των τιμών περιεκτικότητας σε κηρούς C₄₀ έως C₄₆, σε mg/kg λιπαρής ουσίας (ppm).

Σημείωση: Τα συστατικά που πρέπει να προσδιορίζονται ποσοτικά αναφέρονται στις κορυφές που αντιστοιχούν σε εστέρες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα μεταξύ C₄₀ και C₄₆, κατά το παράδειγμα του χρωματογραφήματος κηρών ελαιολάδου που εμφανίζεται στο κατωτέρω σχήμα. Σε περίπτωση διπλής εμφάνισης του εστέρα C₄₆, συνιστάται η ταυτοποίησή του με ανάλυση του κλάσματος των κηρών πυρηνελαίου, όπου η κορυφή C₄₆ αναγνωρίζεται εύκολα, καθώς υπερισχύει σαφώς.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

▼ M21

Σχήμα
Χρωματογράφημα κηρών παρθένου ελαιολάδου ⁽¹⁾



Υπόμνημα:

I.S. = λαυρικός αραχιδεστέρας

1 = Διτερπενικοί εστέρες

2 + 2' = Εστέρες C₄₀

3 + 3' = Εστέρες C₄₂

4 + 4' = Εστέρες C₄₄

5 = Εστέρες C₄₆

6 = Τριτερπενικοί εστέρες στερολών και αλκοόλης.

⁽¹⁾ Μετά την έκλουση των εστέρων των στερολών, το χρωματογράφημα δεν πρέπει να παρουσιάζει σημαντικές κορυφές (τριγλυκερίδια).

▼ M21*Προσάρτημα***Προσδιορισμός της γραμμικής ταχύτητας του αερίου**

Εγχέονται 1 έως 3 μl μεθανίου (ή προπανίου) στον αεριοχρωματογράφο, ο οποίος έχει προηγουμένως ρυθμίζεται στις κανονικές συνθήκες λειτουργίας. Χρονομετρείται η διαδρομή του αερίου μέσω της στήλης από την έγχυσή του μέχρι την εμφάνιση της κορυφής (t_M).

Η γραμμική ταχύτητα, σε cm/s, παρέχεται από τον τύπο L/t_M , όπου L το μήκος της στήλης, σε εκατοστόμετρα, και t_M ο χρόνος, σε δευτερόλεπτα.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΤΩΝ
ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΔΙ' ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΤΡΙΧΟΕΙΔΗ
ΣΤΗΛΗ**

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Η μέθοδος περιγράφει τη διαδικασία προσδιορισμού των περιεχομένων στερολών, σε μια λιπαρή ουσία, μεμονωμένων και ολικών.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η λιπαρή ουσία στην οποία έχει προστεθεί α-χολεστανόλη ως εσωτερικό πρότυπο, σαπωνοποιείται με αιθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου· έπειτα τα ασαπωνοποίητα συστατικά εκχυλίζονται με αιθυλικό αιθέρα. Το στερολικό κλάσμα διαχωρίζεται από τα ασαπωνοποίητα συστατικά δια χρωματογραφίας επί βασικής πλάκας silica gel· οι στερόλες που λαμβάνονται στο silica gel μετατρέπονται σε τριμεθυλοσιλilαιθέρους και αναλύονται με αέριο χρωματογραφία με τριχοειδείς στήλες.

3. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- 3.1. Σφαιρική φιάλη των 250 ml εφοδιασμένη με κάθετο ψυκτήρα με εσφυρισμένα άκρα.
- 3.2. Διαχωριστική χοάνη των 100 ml.
- 3.3. Σφαιρικές φιάλες των 250 ml.
- 3.4. Πλήρης εξοπλισμός για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος με γυάλινες πλάκες των 20 × 20 cm.
- 3.5. Λυχνία υπεριώδους φωτός, μήκους κύματος 366 ή 254 nm.
- 3.6. Μικροσύριγγες των 100 και 500 ml.
- 3.7. Διηθητική κυλινδρική χοάνη με πορώδες φίλτρο G 3 (πορώδους 15 έως 40 μm) διαμέτρου 2 cm περίπου και ύψους 5 cm με άκρο κατάλληλο για διήθηση σε κενό αέρος και εσφυρισμένο άκρο αρσενικό 12/21.
- 3.8. Φιάλη εν κενώ των 50 ml με εσφυρισμένο άκρο θηλυκό 12/21 προσαρμοσμένο στη διηθητική χοάνη (3.7).
- 3.9. Σωλήνας με κωνική βάση, των 10 ml, με πώμα ασφαλείας.
- 3.10. Αέριος χρωματογράφος κατάλληλος για λειτουργία με τριχοειδή στήλη εφοδιασμένος με σύστημα διαχωρισμού, αποτελούμενο από:
 - 3.10.1. Θερμοστατούμενο θάλαμο, για τη στήλη, ο οποίος επιτρέπει τη διατήρηση της επιθυμητής θερμοκρασίας με ακρίβεια ± 1 °C.
 - 3.10.2. Σύστημα εξάτμισης με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία και με σιλανισμένο γυάλινο χώρο.
 - 3.10.3. Ανιχνευτή ► **C1** ιονιζούσης φλογός ◀ και μεταλλάκτη -ενισχυτή.
- 3.10.4. Καταγραφέα-ολοκληρωτή κατάλληλο για λειτουργία με μεταλλάκτη-ενισχυτή.
- 3.11. Τριχοειδής στήλη από γυαλί ή τετηγμένο οξείδιο του πυριτίου, μήκους 20 έως 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, καλυμμένη εσωτερικώς με υγρό SE-52 ή SE-54 ή άλλο ανάλογο, ομοιόμορφου πάχους μεταξύ 0,10 και 0,30 μm.
- 3.12. Μικροσύριγγες για χρωματογραφία αέριας φάσης των 10 μl με σκληρυμένη βελόνα.

▼ **B**

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 4.1. Αιθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου περίπου 2N: διαλύονται, ψύχοντας ταυτόχρονα, 130 g υδροξειδίου του καλίου (κατώτατου τίτλου 85 %) μέσα σε 200 ml απεσταγμένου ύδατος, έπειτα συμπληρώνονται με αιθανόλη μέχρι το ένα λίτρο. Το διάλυμα διατηρείται ► **C1** μέσα σε σκοτεινά και καλά κλεισμένα μπουκάλια ◄.
- 4.2. Αιθυλικός αιθέρας αναλυτικής καθαρότητας.
- 4.3. Άνυδρο θειικό νάτριο, αναλυτικής καθαρότητας.
- 4.4. Γυάλινες πλάκες καλυμμένες με silica gel χωρίς δείκτη φθορισμού, πάχους 0,25 mm (διατίθενται στο εμπόριο έτοιμες ήδη για χρήση).
- 4.5. Αιθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου 0,2 N: διαλύονται 13 g υδροξειδίου του καλίου μέσα σε 20 ml απεσταγμένου ύδατος, έπειτα συμπληρώνονται μέχρι το ένα λίτρο με μεθανόλη.
- 4.6. Βενζόλιο, χρωματογραφικής καθαρότητας (5.2.2).
- 4.7. Ακετόνη, χρωματογραφικής καθαρότητας (5.2.2).
- 4.8. Εξάνιο, χρωματογραφικής καθαρότητας (5.2.2).
- 4.9. Αιθυλικός αιθέρας, χρωματογραφικής καθαρότητας (5.2.2).
- 4.10. Χλωροφόρμιο, αναλυτικής καθαρότητας.
- 4.11. Διάλυμα αναφοράς για χρωματογραφία επί πλακός: χοληστερόλη ή φυτοστερόλη, διάλυμα ► **M6** 2 % ◄ σε χλωροφόρμιο.
- 4.12. Αιθανολικό διάλυμα 2'-7'διχλωροφλονορεσκεΐνης 0,2 %. Έχει γίνει ελαφρά αλκαλικό με την προσθήκη μερικών σταγόνων αλκοολικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου, 2 N.
- 4.13. Άνυδρη πυριδίνη, χρωματογραφικής καθαρότητας.
- 4.14. Εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (Hexamethyldisilazane).
- 4.15. Τριμεθυλοχλωροσιλάνιο.
- 4.16. Διάλυμα αναφοράς των τριμεθυλοσιλαιθέρων των στερολών: παρασκευάζεται τη στιγμή της χρήσης από τις στερόλες που λαμβάνονται από τα έλαια που τις περιείχαν.
- 4.17. α-χολεστανόλη, διάλυμα 0,2 % (m/V) σε χλωροφόρμιο (εσωτερικό πρότυπο).
- 4.18. Φέρον αέριον: υδρογόνο ή ήλιο, χρωματογραφικής καθαρότητας.
- 4.19. Βοηθητικά αέρια: υδρογόνο ή ήλιον, χρωματογραφικής καθαρότητας.

5. ΜΕΘΟΔΟΣ

- 5.1. Παρασκευή των ασαπωνοποίητων συστατικών.
- 5.1.1. Εισάγεται στη σφαιρική φιάλη των 250 ml, δια μικροσύριγγας των 500 μl, όγκος διαλύματος α-χολεστανόλης 0,2 % σε χλωροφόρμιο (4.17) που περιέχει ποσότητα ► **C1** α-χολεστανόλης ◄ που αντιστοιχεί σε 10 % περίπου των στερολών που περιέχονται στο δείγμα που κρατήθηκε για τον προσδιορισμό. Για παράδειγμα, για 5 g δείγματος, πρέπει να προστεθούν 500 μl διαλύματος α-χολεστανόλης 0,2 %, εάν πρόκειται για δείγμα ελαιολάδου, και 1 500 μl, εάν πρόκειται για ► **M6** ————— ◄ πυρηνέλαιο.

Εξατμίζεται τα χλωροφόρμιο σε ρεύμα αζώτου μέχρι να αποξηρανθεί, έπειτα ζυγίζονται ακριβώς 5 g ξηρού διηθημένου δείγματος στην ίδια σφαιρική φιάλη.

▼B

Στην περίπτωση των ελαίων ►M6 — τα οποία περιέχουν σημαντικές ποσότητες χοληστερόλης, μπορεί να εμφανιστεί κορυφή η οποία έχει τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με αυτόν της χολεστανόλης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, πρέπει να αναλύεται το στερολικό κλάσμα εις διπλούν, με και χωρίς εσωτερικό πρότυπο ►M6 ή να χρησιμοποιείται βετουλινόλη αντί χοληστανόλης ◄.

- 5.1.2. Προστίθενται 50 ml αιθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου 2 N, τίθεται σε λειτουργία ο κάθετος ψυκτήρας, θερμαίνεται σε υδατόλουτρο μέχρι ήπιο βρασμό, ανακινώντας ταυτόχρονα δυνατά μέχρι να πραγματοποιηθεί η σαπωνοποίηση (το διάλυμα γίνεται διαυγές). Συνεχίζεται η θέρμανση για 20 λεπτά, έπειτα προστίθενται 50 ml απεσταγμένου ύδατος τα οποία ρίχνονται από το επάνω μέρος του ψυκτήρα, αποσυνδέεται ο ψυκτήρας και ψύχεται η σφαιρική φιάλη στους 30 °C.

- 5.1.3. Μεταγγίζεται ποσοτικώς το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης σε διαχωριστική χοάνη των 500 ml, με τη βοήθεια απεσταγμένου ύδατος, πολλές φορές, χρησιμοποιώντας συνολικά περίπου 50 ml. Προστίθενται περίπου 80 ml αιθυλικού αιθέρα, ανακινώντας δυνατά για περίπου 30 δευτερόλεπτα, και αφήνεται να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός (Σημείωση 1).

Διαχωρίζεται η κάτω υδατική φάση συλλέγοντάς τη μέσα σε μια άλλη φιάλη μετάγγισης. Πραγματοποιούνται ακόμη δύο εκχυλίσσεις της υδατικής φάσης, σύμφωνα με τις ίδιες οδηγίες, χρησιμοποιώντας κάθε φορά 60-70 ml αιθυλικού αιθέρα.

Σημείωση 1: Τα πιθανά γαλακτώματα μπορούν να καταστραφούν προσθέτοντας μικρές ποσότητες αιθυλικής ή μεθυλικής αλκοόλης δια ψεκασμού.

- 5.1.4. Συγκεντρώνονται τα αιθερικά εκχυλίσματα σε μια μόνο διαχωριστική χοάνη και πλένονται με απεσταγμένο ύδωρ (50 ml κάθε φορά) μέχρι ουδέτερης αντίδρασης του ύδατος έκπλυσης.

Αφού απομακρυνθεί το ύδωρ έκπλυσης, ξηραίνονται με άνυδρο θειικό νάτριο και διηθούνται, πάνω σε άνυδρο θειικό νάτριο, σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη των 250 ml, πλένοντας φιάλη και φίλτρο με μικρές ποσότητες αιθυλικού αιθέρα.

- 5.1.5. Αποστάζεται ο αιθέρας μέχρις ότου να απομείνει μικρή ποσότητα, έπειτα αποξηραίνεται σε ελαφρό κενό ή σε ρεύμα αζώτου, ολοκληρώνεται η ξήρανση στον κλίβανο στους 100 °C για ένα τέταρτο της ώρας περίπου και ζυγίζεται μετά από ψύξη σε ξηραντήρα.

- 5.2. Διαχωρισμός του στερολικού κλάσματος.

- 5.2.1. Προετοιμασία των βασικών πλακών: βυθίζονται οι πλάκες από silica gel (4.4), τελείως, μέσα σε μεθανολικό διάλυμα 0,2 N υδροξειδίου του καλίου (4.5) για 10 δευτερόλεπτα, αφήνονται στη συνέχεια κλεισμένες σε σκοτεινό θάλαμο για δύο ώρες και τοποθετούνται τελικά στον κλίβανο σε 100 °C για μία ώρα.

Βγαίνουν από τον κλίβανο και διατηρούνται μέσα σε ένα ξηραντήρα με χλωριούχο ασβέστιο μέχρι τη στιγμή της χρήσης (οι κατ' αυτόν τον τρόπο επεξεργασμένες πλάκες πρέπει να χρησιμοποιούνται μέσα σε δεκαπέντε μέρες).

Σημείωση 2: Η χρήση των βασικών πλακών silica gel για το διαχωρισμό του στερολικού κλάσματος καταργεί την ανάγκη επεξεργασίας των ασαπωνοποιητών συστατικών με την αλουμίνα. Με αυτόν τον τρόπο, όλα τα όξινα συστατικά (λιπαρά οξέα και άλλα) συγκρατούνται στη γραμμή εναπόθεσης. Επιτυγχάνεται έτσι η ζώνη των στερολών καθαρά διαχωρισμένη από την ταινία των αλειφατικών και τερπενικών αλκοολών.

▼B

- 5.2.2. Εισάγεται στο θάλαμο ανάπτυξης ένα μείγμα βενζόλιου-ακετόνης 95/5 (V/V) μέχρι ένα ύψος περίπου 1 cm. Είναι δυνατόν στη θέση του να χρησιμοποιηθεί ένα μείγμα εξάνιου-αιθυλικού αιθέρα 65/35 (V/V). Ο θάλαμος κλείνεται με τη βοήθεια ενός κατάλληλου σκεπάσματος και αφήνεται έτσι για μισή ώρα τουλάχιστον, έτσι ώστε να αποκατασταθεί ισορροπία μεταξύ υγρού και ατμού. Είναι δυνατόν, να τοποθετηθούν στις εσωτερικές επιφάνειες του θαλάμου λωρίδες από διηθητικό χαρτί βυθισμένες στο υγρό ανάπτυξης: με αυτό τον τρόπο θα μειωθεί στο ένα τρίτο περίπου ο χρόνος μετακίνησης του μετώπου του υγρού και θα επιτευχθεί περισσότερο ομοιόμορφη έκλυση.

Σημείωση 3: Για να υπάρξουν αναπαραγώγιμες συνθήκες έκλυσης, το μείγμα πρέπει να αλλάζει κάθε φορά.

- 5.2.3. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα 5 % περίπου ασαπωνοποιητών συστατικών (5.1.5) μέσα σε χλωροφόρμιο και με τη μικροσύριγγα των 100 μl τοποθετείται στη χρωματογραφική πλάκα (5.2.1), στα 2 cm περίπου από το ένα άκρο, 0,3 ml του ανωτέρω διαλύματος σε μια συνεχή γραμμή, όσο το δυνατόν πιο λεπτή και ομοιόμορφη. Στην ευθεία της γραμμής εναπόδεσης, τοποθετείται στο ένα άκρο της πλάκας 2-3 μl του διαλύματος αναφοράς των στερολών (4.11), με σκοπό να προσδιορισθεί η λωρίδα των στερολών μετά το πέρας της ανάπτυξης.
- 5.2.4. Τοποθετείται η πλάκα μέσα στο θάλαμο ανάπτυξης, προετοιμασμένη όπως περιγράφεται στην 5.2.2. Η θερμοκρασία περιβάλλοντος πρέπει να διατηρείται ανάμεσα στους 15 και 20 °C. Κλείνεται αμέσως ο θάλαμος με το σκέπασμα και αφήνεται μέχρις ότου το μέτωπο του διαλυτή να ανέλθει σε ύψος 1 cm κάτω από το άνω άκρο της πλάκας. Βγαίνει στη συνέχεια η πλάκα από το θάλαμο ανάπτυξης και ο διαλύτης εξατμίζεται μέσα σε ρεύμα ζεστού αέρα ή ακόμη αφήνοντας την πλάκα σε σκοτεινό θάλαμο για λίγο.
- 5.2.5. Η πλάκα ψεκάζεται ελαφρά και με ομοιόμορφο τρόπο με το διάλυμα της 2'7'δichλωροφλουοροσκεΐνης. Τοποθετείται η λωρίδα των στερολών δια ευθυγράμμισης με την κηλίδα που επιτεύχθηκε με το διάλυμα αναφοράς· η λωρίδα οριοθετείται με ένα μαύρο μολύβι κατά μήκος των άκρων φθορισμού.
- 5.2.6. Το silica gel που περιέχεται στην οριοθετημένη ζώνη ξύνεται με μια μεταλλική σπάτουλα. Το υλικό που αφαιρείται, λεπτά κονιοποιημένο, εισάγεται σε μια διηθητική χοάνη (3.7). Προστίθενται 10 ml θερμού χλωροφόρμιου, αναμιγνύονται προσεκτικά με τη μεταλλική σπάτουλα και διηθούνται εν κενώ· έπειτα συλλέγεται το διήθημα στη φιάλη (3.8) που συνδέεται με τη διηθητική χοάνη.

Πλένεται το υπόλειμμα στη χοάνη τρεις φορές με αιθυλικό αιθέρα (περίπου 10 ml κάθε φορά και συλλέγεται όμοια το διήθημα μέσα στη φιάλη την προσαρμοσμένη στη διηθητική χοάνη. Εξατμίζεται το διήθημα μέχρι να φτάσει σ' έναν όγκο περίπου 4-5 ml, μεταγγίζεται το απομένον διάλυμα μέσα στον προζυγισμένο σωλήνα των 10 ml (3.9), ξεραίνεται θερμαίνοντας ελαφρά σε ελαφρύ ρεύμα αζώτου, προστίθενται μερικές σταγόνες ακετόνης, ξεραίνεται εκ νέου, τοποθετείται 10 λεπτά περίπου στον κλίβανο στους 105 °C, έπειτα αφήνεται να κρυώσει σε ξηραντήρα και ζυγίζεται.

Το περιεχόμενο υπόλειμμα μέσα στο σωλήνα αποτελείται από το στερολικό κλάσμα.

- 5.3. Παρασκευή των τριμεθυλοσιλilαιθέρων.
- 5.3.1. Στο σωλήνα που περιέχει το στερολικό κλάσμα προστίθεται το αντιδραστήριο σιλανοποίησης αποτελούμενο από μείγμα πυριδίνης-εξαμεθυλοδισilαζάνιου-τριμεθυλοχλωρilsilάνιον 9/3/1 (V/V/V) (Σημείωση 4) σε αναλογία 50 μl ανά χιλιστό του γραμμαρίου των στερολών, αποφεύγοντας κάθε απορρόφηση υγρασίας (Σημείωση 5).

Σημείωση 4: Υπάρχουν στο εμπόριο διαλύματα έτοιμα προς χρήση· επιπλέον, άλλα αντιδραστήρια σιλilαιθεροποίησης όπως, για παράδειγμα, το δις-τριμεθυλοσιlilακεταμίδιο + 1 % τριμεθυλοχλωρilsilάνιο διαλυμένο με τον ίδιο όγκο ανύδρης πυριδίνης.

▼B

- 5.3.2. Κλείνεται ο σωλήνας, ανακινείται προσεκτικά (χωρίς να αναστρέφεται) μέχρι την πλήρη διάλυση των στερολών. Αφήνεται να ηρεμήσει για τουλάχιστον 15 λεπτά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, έπειτα φυγοκεντρείται για μερικά λεπτά: το διαυγές διάλυμα είναι έτοιμο για την ανάλυση δια χρωματογραφίας αέριας φάσης.

Σημείωση 5: Ο σχηματισμός ελαφρού θολώματος είναι φυσιολογικός και δεν δημιουργεί καμία επιπλοκή. Ο σχηματισμός άσπρων νιφάδων ή η εμφάνιση ροζ χρώματος οφείλονται στην παρουσία υγρασίας ή στη φθορά του αντιδραστηρίου. Σ' αυτή την περίπτωση, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί.

- 5.4. Ανάλυση δια χρωματογραφίας αέριας φάσης.
- 5.4.1. Προπαρασκευαστικές ενέργειες, ρύθμιση των συνθηκών λειτουργίας της στήλης.
- 5.4.1.1. Η στήλη εγκαθίσταται μέσα στο χρωματογράφο αέριας φάσης, συνδέοντας το άκρο της εισόδου με τον εξαερωτή τον ενωμένο με το σύστημα κλασματοποίησης και το άκρο της εξόδου με τον ανιχνευτή.

Ελέγχεται γενικά η μονάδα του αερίου χρωματογράφου (διαρροές στα κυκλώματα των αερίων, διαχωριστική ικανότητα του ανιχνευτή αποτελεσματικότητα του συστήματος κλασματοποίησης και του συστήματος καταγραφής κ.λπ.).

- 5.4.1.2. Εάν η στήλη χρησιμοποιείται για πρώτη φορά, συνιστάται να κοντισιοναρισθεί. Περνάται ένα ελαφρό ρεύμα αερίου δια μέσου αυτής της στήλης, έπειτα ανάβεται το σύνολο της χρωματογραφίας αέριας φάσης και ξεκινά η βαθμιαία θέρμανση μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία το λιγότερο 20 °C μεγαλύτερη απ' αυτή της λειτουργίας (Σημείωση 6). Διατηρείται αυτή η θερμοκρασία για τουλάχιστον δύο ώρες, έπειτα η μονάδα τίθεται σε συνθήκες λειτουργίας (ρύθμιση ροής αερίων και της κλασματοποίησης, άναμμα της φλόγας, σύνδεση με τον ηλεκτρονικό καταγραφέα, ρύθμιση της θερμοκρασίας του θαλάμου για τη στήλη, του ανιχνευτή και του συστήματος έγχυσης κ.λπ.) και καταγράφεται το σήμα σε μια ευαισθησία τουλάχιστον δύο φορές μεγαλύτερη από αυτή που προβλέπεται για την εκτέλεση της ανάλυσης. Η γραμμή βάσεως που επιτεύχθηκε πρέπει να είναι ευθύγραμμη, χωρίς κορυφές οιασδήποτε μορφής και παρεκκλίσεις.

Η αρνητική ευθύγραμμη παρέκκλιση δηλώνει διαρροή της στήλης, μια θετική παρέκκλιση δηλώνει ανεπαρκή ρύθμιση της στήλης (κοντισιονάρισμα).

Σημείωση 6: Η θερμοκρασία κοντισιοναρίσματος, της στήλης πρέπει να είναι πάντα μικρότερη, τουλάχιστον 20 °C, από τη μέγιστη προβλεπόμενη θερμοκρασία για τη χρησιμοποιούμενη στατική φάση της στήλης.

- 5.4.2. Επιλογή των συνθηκών εργασίας
- 5.4.2.1. Οι προτεινόμενες συνθήκες εργασίας είναι οι ακόλουθες:
- θερμοκρασία της στήλης: 260 °C \pm 5 °C,
 - θερμοκρασία του συστήματος εξαερωσης: 280 °C,
 - θερμοκρασία του ανιχνευτή: 290 °C,
 - γραμμική ταχύτητα του φέροντος αερίου: ήλιο, 20 έως 35 cm/s, υδρογόνο, 30 έως 50 cm/s,
 - σχέση διαχωρισμού: από 1/50 έως 1/100,
 - ευαισθησία του οργάνου: 4 έως 16 φορές της ελάχιστης ευαισθησίας,
 - ευαισθησία καταγραφής: 1-2 mV f. s.,
 - ταχύτητα του χαρτιού: 30-60 cm/ώρα,

▼B

— ποσότητα εγχέομενης ουσίας: 0,5-1 μl του διαλύματος των TMSE.

Αυτές οι συνθήκες μπορούν να μεταβάλλονται σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά της στήλης και του χρωματογράφου αέριας φάσης, έτσι ώστε να επιτυγχάνονται χρωματογραφήματα τα οποία να ικανοποιούν τις ακόλουθες συνθήκες:

— ο χρόνος κατακράτησης της β-σιτοστερόλης πρέπει να είναι 20 ± 5 λεπτά,

— η κορυφή της καμπεστερόλης πρέπει να είναι: για το ελαιόλαδο (μέσο περιεχόμενο 3 %) 15 ± 5 % της πλήρους κλίμακας, για το σογιέλαιο (μέσο περιεχόμενο 20 %) 80 ± 10 % της πλήρους κλίμακας,

— πρέπει να γίνεται διαχωρισμός όλων των υπαρχουσών στερολών. Επιπροσθέτως, για να διαχωρισθούν οι κορυφές πρέπει να έχουν ξεχωρίσει τελείως, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η καμπύλη κάθε κορυφής πρέπει να επιστρέψει στη γραμμή βάσεως πριν ξεκινήσει για την καμπύλη της επόμενης κορυφής. Ένας ατελής διαχωρισμός είναι, παρ' όλα αυτά, ανεκτός, υπό την προϋπόθεση, όμως, ότι θα είναι μετρήσιμος ποσοτικά η κορυφή TRR 1,02 χρησιμοποιώντας την κάθετο.

5.4.3. Εκτέλεση της ανάλυσης

5.4.3.1. Λαμβάνεται, με μια μικροσύριγγα των 10 μl, 1 μl εξάνιο, αναρροφούνται 0,5 μl αέρα και έπειτα 0,5-1 μl του διαλύματος του δείγματος· επίσης τραβιέται το έμβολο της σύριγγας έτσι ώστε η βελόνα να είναι κενή. Εισάγεται η βελόνα μέσω της μεμβράνης του συστήματος έγχυσης και, μετά από 1-2 δευτερόλεπτα, εγχύεται γρήγορα και ύστερα βγαίνει η βελόνα αργά, μετά από 5 δευτερόλεπτα περίπου.

5.4.3.2. Η καταγραφή προχωρά μέχρι την πλήρη έκλυση των TMSE των παρουσών στερολών.

Η γραμμή βάσεως πρέπει πάντα να πληροί τις απαιτούμενες προϋποθέσεις (5.4.1.2).

5.4.4. Ταυτοποίηση των κορυφών

Η ταυτοποίηση των κορυφών πραγματοποιείται με βάση το χρόνο κατακράτησης και σε σύγκριση με το μείγμα των TMSE των στερολών, αναλυόμενων υπό τις ίδιες συνθήκες.

Οι στερόλες εκλούνται με την ακόλουθη σειρά: χοληστερόλη, βραδικαστερόλη, ►C1 24-μεθυλενο ◄-χοληστερόλη, καμπεστερόλη, καμπεστανόλη, στιγμαστερόλη, Δ7 καμπεστερόλη, Δ5, 23 στιγμασταδιενόλη, ►C1 κλεροστερόλη ◄, Β-σιτοστερόλη, σιτοστανόλη, Δ5-αβεναστερόλη, 5,24 στιγμασταδιενόλη, Δ7-στιγμαστενόλη, Δ7-αβεναστερόλη.

Στον πίνακα I αναφέρονται οι χρόνοι κατακράτησης οι σχετικοί με τη σιτοστερόλη για τις στήλες SE 52 και SE 54.

Τα σχήματα 1 και 2 παρουσιάζουν τα τυπικά χρωματογραφήματα μερικών ελαίων.

5.4.5. Ποσοτική αξιολόγηση

5.4.5.1. Πραγματοποιείται, με τον ολοκληρωτή, ο υπολογισμός του εμβαδού των κορυφών της α-χολεστανόλης και των στερολών. Να μην λαμβάνονται υπόψη οι πιθανές κορυφές των συστατικών που δεν περιέχονται σε αυτά που αριθμούνται στον πίνακα I. Ο ανάλογος συντελεστής για την α-χολεστανόλη πρέπει να είναι ίσος με 1.

5.4.5.2. Υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε στερόλης ξεχωριστά σε mg/100 g λιπαρής ουσίας, ως ακολούθως:

$$\text{στερόλη X} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m}$$

▼ B

όπου:

A_x = εμβαδόν της κορυφής της στερόλης x ► **M6** ————— ◄,

A_s = εμβαδόν της κορυφής της α-χολεστανόλης ► **M6** ————— ◄,

m_s = βάρος της α-χολεστανόλης που προσετέθη, σε χιλιοστά του γραμμαρίου,

μ = βάρος του δείγματος που λήφθηκε για τον προσδιορισμό, σε γραμμάρια.

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

6.1. Αναφέρονται οι συγκεντρώσεις για καθεμία από τις στερόλες ξεχωριστά σε mg/100 g λιπαρής ουσίας, και το άθροισμα τους ως «ολικές στερόλες».

6.2. Υπολογίζεται η εκατοστιαία αναλογία κάθε μεμονωμένης στερόλης από το λόγο του εμβαδού της αντίστοιχης κορυφής προς το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών των στερολών.

$$\% \text{ στερόλης } x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

όπου:

A_x = εμβαδόν της κορυφής x,

$\sum A$ = άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών.

▼ B

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ I

Προσδιορισμός της γραμμικής ταχύτητας του αερίου

Στο χρωματογράφο αέριας φάσης, ρυθμισμένο στις κανονικές συνθήκες λειτουργίας, εγχέονται 1 έως 3 μl μεθάνιου (ή προπάνιου) και χρονομετράται ο χρόνος που χρειάζεται το αέριο για να διασχίσει τη στήλη, από τη στιγμή της έγχυσης έως την εμφάνιση της κορυφής (tM).

Η γραμμική ταχύτητα σε cm/s δίνεται από τη σχέση L/tM , όπου L είναι το μήκος της στήλης σε εκατοστά και tM ο χρονομετρημένος χρόνος σε δευτερόλεπτα.

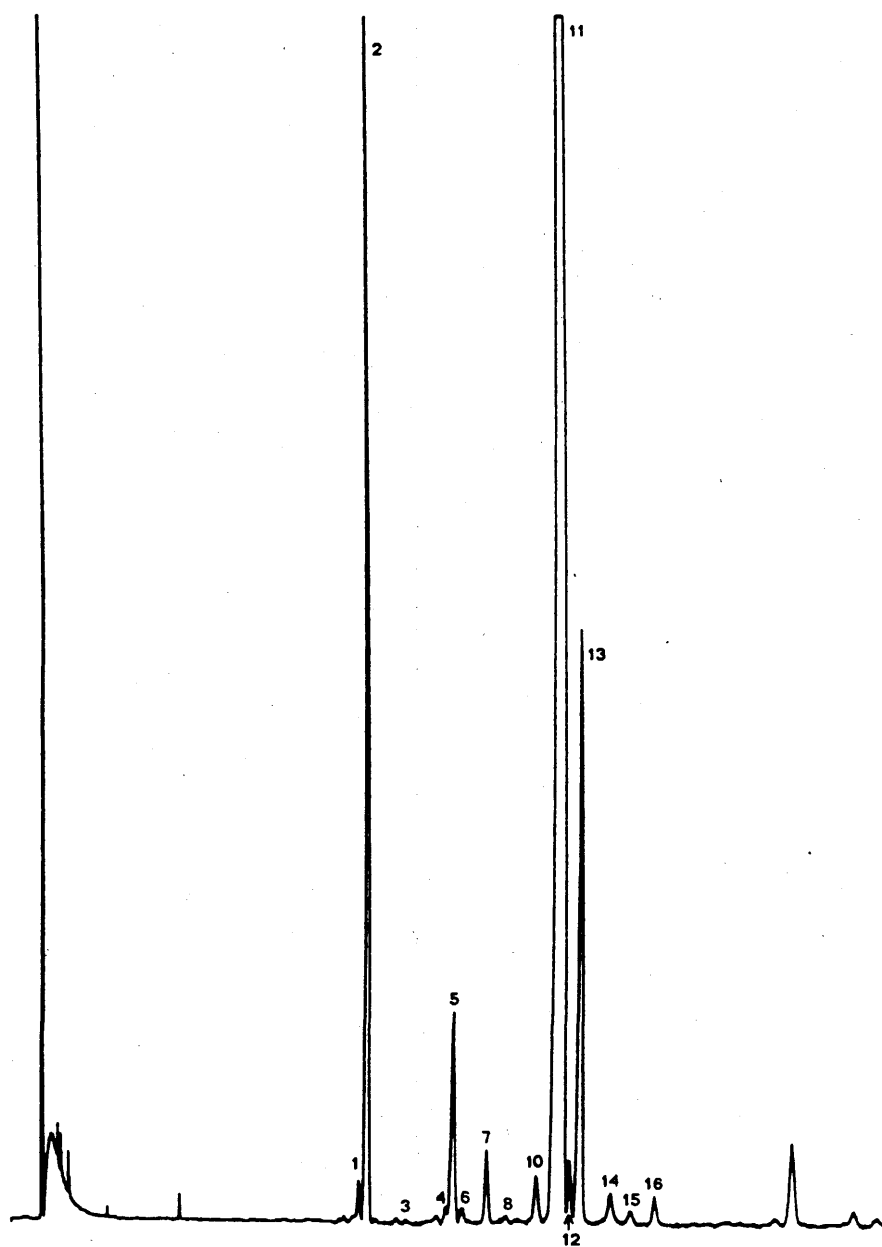
Πίνακας I

Σχετικοί χρόνοι κατακράτησης των στερολών

Κορυφή	Ταυτοποίηση		Σχετικός χρόνος κατακράτησης	
			Στήλη SE 54	Στήλη SE 52
1	χοληστερόλη	Δ5-χοληστεν-3β-ολη	0,67	0,63
2	► <u>C1</u> χολεστανόλη ◀	5α-χολησταν-3β-ολη	0,68	0,64
3	βρασικάστερόλη	[24S]-24-μεθυλ-Δ5,22-χολεσταδιεν-3β-ολη	0,73	0,71
4	24-μεθυλένιο χοληστερόλη	24-μεθυλένιο, Δ5,24-χολεσταδιεν-3β-ολη	0,82	0,80
5	καμπεστερόλη	[24R]-24-μεθυλ-Δ5χοληστεν-3β-όλη	0,83	0,81
6	καμπεστανόλη	[24]24-μεθυλ-χολησταν-3β-ολη	0,85	0,82
7	στιγμαστερόλη	[24S]-24-αιθυλ-Δ5,22-χολεσταδιεν-3β-ολη	0,88	0,87
8	Δ7-καμπεστερόλη	[24R]-24-μεθυλ-Δ7-χοληστεν-3β-ολη	0,93	0,92
9	Δ5,23-στιγμασταδιενόλη	[24R,S]-24-αιθυλ-Δ5,23-χολεσταδιεν-3β-ολη	0,95	0,95
10	► <u>C1</u> κλεροστερόλη ◀	[24S]-24-αιθυλ-Δ5,25-χολεσταδιεν-3β-ολη	0,96	0,96
11	β-σιτοστερόλη	[24R]-24-αιθυλ-Δ5-χολεσταν-3β-ολη	1,00	1,00
12	σιτοστανόλη	24-αιθυλ-χολησταν-3β-ολη	1,02	1,02
13	Δ5-αβεναστερόλη	[24Z]-24-αιθυλιδεν-Δ5-χολησταν-3β-ολη	1,03	1,03
14	Δ5,24 στιγμαστα-διενόλη	[24R,S]-24-αιθυλ-Δ5,24-χολεσταδιεν-3β-ολη	1,08	1,08
15	Δ7-στιγμαστενόλη	[24R,S]-24-αιθυλ-Δ7,24-χολεσταδιεν-3β-ολη	1,12	1,12
16	► <u>C1</u> 17-αβεναστερόλη ◀	[24Z]-24-αιθυλιδεν-Δ7-χολεστεν-3β-ολη	1,16	1,16

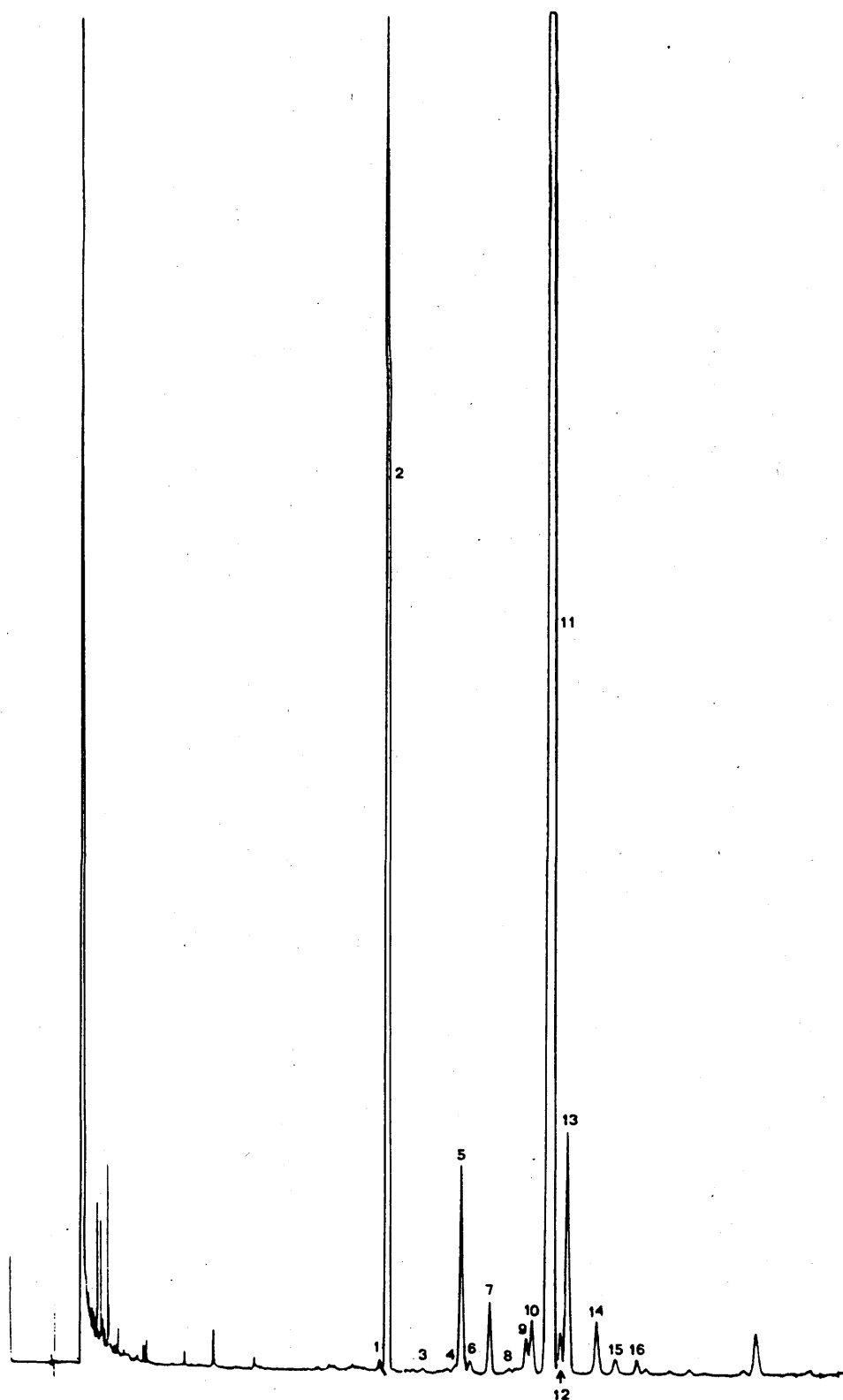
▼ B

Σχήμα 1

Χρωματογραφία αέριας φάσης του στερολικού κλάσματος ακατέργαστου ελαιολάδου

▼ B

Σχήμα 2

Χρωματογραφία αέριας φάσης του στερολικού κλάσματος εξευγενισμένου ελαιολάδου



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΡΥΘΡΟΔΙΟΛΗΣ ΚΑΙ ΟΥΒΑΟΛΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ερυθροδιόλη (συνήθως γνωστή ως η διόλη ερυθροδιόλη μαζί με τη διόλη ουβαόλη) είναι ένα συστατικό του μη σαπωνοποιήσιμου κλάσματος, χαρακτηριστικού ορισμένων τύπων λιπαρών ουσιών. Συναντάται σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ελαιόλαδο εξ εκχυλίσσεως από ό,τι σε άλλα έλαια, (όπως ελαιόλαδο εξ εκθλίψεως και έλαιο σταφυλόσπορου, τα οποία την περιέχουν επίσης) και επομένως η παρουσία της μπορεί να υποδηλώνει τη παρουσία ελαιόλαδου εξ εκχυλίσσεως.

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Η μέθοδος περιγράφει μία διαδικασία ανίχνευσης ερυθροδιόλης σε λιπαρές ουσίες.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η λιπαρή ουσία σαπωνοποιείται με υδροξείδιο του καλίου σε αιθανολικό διάλυμα. Το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα εκχυλίζεται κατόπιν με αιθυλικό αιθέρα και καθαρίζεται με διέλευση μέσα από στήλη αλουμίνιας.

Τα μη σαπωνοποιήσιμα μέρη υπόκεινται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε πλάκα διοξειδίου του πυρίτιου έως ότου διαχωριστούν οι στοιβάδες που αντιστοιχούν στα κλάσματα στερολών και ερυθροδιόλης. Οι επανακτούμενες από την πλάκα στερόλες και η ερυθροδιόλη μετατρέπονται σε τριμεθυλοσιλυλοαιθέρες και το μείγμα αναλύεται με αέρια χρωματογραφία.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως το ποσοστό ερυθροδιόλης στο μείγμα ερυθροδιόλης και στερολών.

3. ΟΡΓΑΝΑ

- 3.1. Τα όργανα περιγράφονται στο παράρτημα V (προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε στερόλες).

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 4.1. Τα αντιδραστήρια περιγράφονται στο παράρτημα V (προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε στερόλες).

- 4.2. Διάλυμα αναφοράς ερυθροδιόλης, διάλυμα 0,5 % σε χλωροφόρμιο.

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1. Προπαρασκευή των ασαπωνοποιήτων.

Όπως περιγράφεται στη παράγραφο 5.1.2. του παραρτήματος V.

5.2. Διαχωρισμός της ερυθροδιόλης και των στερολών.

- 5.2.1. Βλέπε παράγραφο 5.2.1 της μεθόδου του παραρτήματος V.

- 5.2.2. Βλέπε παράγραφο 5.2.2 της ανωτέρω μεθόδου.

- 5.2.3. Παρασκευάζεται διάλυμα 5 % των ασαπωνοποιήτων σε χλωροφόρμιο. Χρησιμοποιώντας τη μικροσύριγγα του 0,1 ml, στρώνεται μία χρωματογραφική πλάκα με 0,3 ml διαλύματος περίπου 1,5 cm από το κατώτερο άκρο σε μία γραμμή κατά το δυνατό λεπτή και ομοιόμορφη. Στη μία άκρη της πλάκας τοποθετούνται λίγα μικρολίτρα από τα διαλύματα χολεστερόλης και ερυθροδιόλης ως αναφορά.

- 5.2.4. Η πλάκα τοποθετείται μέσα στο θάλαμο ανάπτυξης που έχει προετοιμαστεί κατά τα καθοριζόμενα στην 5.2.1. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος πρέπει να είναι περίπου 20 °C. Ο θάλαμος κλείνεται αμέσως με το κάλυμμα και αφήνεται να γίνει έκλυση έως ότου το μέτωπο του διαλύτη φτάσει σε απόσταση περίπου 1 cm από το ανώτερο άκρο της πλάκας. Κατόπιν η πλάκα απομακρύνεται από το θάλαμο ανάπτυξης και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα θερμού αέρα.

▼ B

5.2.5. Η πλάκα ψεκάζεται ελαφρά και ομοιόμορφα με το αλκοολικό διάλυμα της ► C1 2-7 διχλωροφλουορεσκεΐνης ◄. Όταν η πλάκα παρατηρείται υπό υπεριώδες φώς, οι στοιβάδες των στερολών και της ερυθροδιόλης μπορούν να αναγνωρισθούν από την ευθυγράμμισή τους με τις κηλίδες αναφοράς. Τα όρια της περιοχής φθορισμού σημαίνονται με ένα σημάδι μόλις έξω από αυτά.

5.2.6. Χρησιμοποιώντας μία μεταλλική σπάτουλα, αποξέεται το πήγμα διοξειδίου του πυρίτιου εντός των σημανθέντων περιοχών από τη πλάκα και μεταφέρεται σε φιάλη των 50 ml. Προστίθενται 15 ml θερμού χλωροφόρμιου, αναδεύονται καλά και διηθούνται μέσα από χωνί με διάτρητο γυάλινο δίσκο, έτσι ώστε το πήγμα του διοξειδίου του πυρίτιου να μεταφερθεί στον ηθμό. Εκπλύεται τρεις φορές με θερμό χλωροφόρμιο (10 ml κάθε φορά), συλλέγοντας το διήθημα σε φιάλη των 100 ml. Το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρις όγκου 4-5 ml, μεταφέρεται σε βαθμονομημένο σωλήνα φυγοκέντρησης των 10 ml, με κωνικό πυθμένα, ξηραίνεται με ήπια θέρμανση σε ρεύμα αζώτου και ζυγίζεται.

5.3. Παρασκευή των τριμεθυλοσιλολαιθέρων.

Όπως περιγράφεται στη παράγραφο 5.3 της μεθόδου που παραρτήματος V.

5.4. Αέρια χρωματογραφική ανάλυση.

Όπως περιγράφεται στη παράγραφο 5.4 της ανωτέρω μεθόδου.

Οι συνθήκες εκτέλεσης της αέριας χρωματογραφικής ανάλυσης πρέπει να είναι τέτοιες ώστε να εκτελείται η ανάλυση των στερολών και να διαχωρίζονται οι ΤΜΣΕ από την ερυθροδιόλη και την ουβαόλη.

Από τη στιγμή που το δείγμα έχει εγχυθεί, η καταγραφή συνεχίζεται έως ότου εκλουθούν οι υπάρχουσες στερόλες, η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη. Μετά αναγνωρίζονται οι κορυφές (οι χρόνοι κατακράτησης της ερυθροδιόλης και ουβαόλης αναφορικά προς τη β-σιτοστερόλη είναι περίπου 1,4 και 1,55 αντίστοιχα) και υπολογίζονται τα εμβαδά σχετικά με τις στερόλες.

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

$$\text{Ερυθροδιόλη \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{στερολών}}} \times 100$$

όπου:

A_1 = εμβαδό κορυφής ερυθροδιόλης ► M6 ————— ◄,

A_2 = εμβαδό κορυφής ουβαόλης ► M6 ————— ◄,

$\sum A_{\text{στερολών}}$ = ολικό εμβαδό κορυφών στερολών ► M6 ————— ◄.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

▼ **M21***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII***ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΑΤΟΣΤΙΑΙΑΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ 2-ΜΟΝΟΠΑΛΜΙΤΙΝΗΣ****1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Στην παρούσα μέθοδο περιγράφεται η αναλυτική διαδικασία για τον προσδιορισμό της εκατοστιαίας αναλογίας παλμιτικού οξέος στη θέση 2 των τριγλυκεριδίων μέσω της εκτίμησης της 2-μονοπαλμιτίνης.

Η παρούσα μέθοδος έχει εφαρμογή στα φυτικά έλαια που είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C).

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μετά την παρασκευή του, το δείγμα ελαιολάδου υφίσταται την επίδραση παγκρεατικής λιπάσης: λόγω μερικής και εξειδικευμένης υδρόλυσης στις θέσεις 1 και 3 του μορίου του τριγλυκεριδίου, σχηματίζονται μονογλυκερίδια στη θέση 2. Μετά από σιλυλίωση (σιλανοποίηση), προσδιορίζεται η εκατοστιαία αναλογία 2-μονοπαλμιτίνης στο κλάσμα των μονογλυκεριδίων με αέρια χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης.

3. ΣΥΝΗΘΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- 3.1. Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) των 25 ml
- 3.2. Ποτήρια ζέσεως των 100, 250 και 300 ml
- 3.3. Γυάλινη χρωματογραφική στήλη, εσωτερικής διαμέτρου 21-23 mm και μήκους 400 mm, εφοδιασμένη με πλάκα από συντετηγμένο γυαλί και στρόφιγγα
- 3.4. Ογκομετρικοί κύλινδροι των 10, 50, 100 και 200 ml
- 3.5. Σφαιρικές φιάλες των 100 και 250 ml
- 3.6. Περιστροφικός εξατμιστήρας
- 3.7. Σωλήνες φυγοκέντρου των 10 ml, με κωνικό πυθμένα και εσφυρισμένο πάμα
- 3.8. Φυγόκεντρος για σωλήνες των 10 και 100 ml
- 3.9. Θερμοστάτης ικανός να διατηρεί τη θερμοκρασία στους $40 \pm 0,5$ °C
- 3.10. Βαθμολογημένα σιφόνια του 1 και των 2 ml
- 3.11. Υποδερμική σύριγγα του 1 ml
- 3.12. Μικροσύριγγα των 100 μl
- 3.13. Διαχωριστική χοάνη των 1 000 ml
- 3.14. Αεριοχρωματογράφος για τριχοειδείς στήλες, εφοδιασμένος με σύστημα έγχυσης εν ψυχρώ «on column» για απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη και με κλίβανο ικανό να διατηρεί την επιλεγόμενη θερμοκρασία με ακρίβεια 1 °C
- 3.15. Σύστημα έγχυσης εν ψυχρώ «on column» για απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη
- 3.16. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας και ηλεκτρόμετρο
- 3.17. Καταγραφέας-ολοκληρωτής κατάλληλος για το ηλεκτρόμετρο, με χρόνο απόκρισης που δεν υπερβαίνει το 1 δευτερόλεπτο και με μεταβλητή ταχύτητα χαρτιού
- 3.18. Τριχοειδής στήλη από γυαλί ή τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, μήκους 8 έως 12 μέτρων, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, επικαλυμμένη με μεθυλοπολυσιλοξάνιο ή φαινυλοπολυσιλοξάνιο 5 %, πάχους 0,10 έως 0,30 μm, με δυνατότητα χρήσης στους 370 °C

▼ **M21**

- 3.19. Μικροσύριγγα των 10 μl για την απευθείας εισαγωγή στη στήλη, μήκους τουλάχιστον 7,5 cm, με συγκολλημένη στο σώμα της βελόνα

4. **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

- 4.1. Διοξείδιο του πυριτίου (silica gel) κοκκομετρικού βαθμού μεταξύ 0,063 και 0,200 mm (70/280 mesh), που παρασκευάζεται ως εξής: τοποθετείται η silica gel σε κάψα από πορσελάνη, ξηραίνεται στο πυριατήριο στους 160 °C επί 4 ώρες και, κατόπιν, αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέσα σε ξηραντήρα. Προστίθεται ποσότητα νερού ίση με 5 % του βάρους του silica gel ως εξής: σε φιάλη Erlenmeyer των 500 ml ζυγίζονται 152 g silica gel και προστίθενται 8 g απεσταγμένου νερού. Η φιάλη πωματίζεται και το σύνολο ανακινείται ήπια, ώστε να επιτευχθεί ομοιογενής κατανομή του νερού, και αφήνεται σε ηρεμία τουλάχιστον επί 12 ώρες πριν χρησιμοποιηθεί.

- 4.2. n-εξάνιο (χρωματογραφικής καθαρότητας)

- 4.3. Ισοπροπανόλη

- 4.4. Υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης 1:1 (κ.ό.)

- 4.5. Παγκρεατική λιπάση. Η δραστηριότητα της χρησιμοποιούμενης λιπάσης πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 2,0 και 10 μονάδων λιπάσης ανά mg. (Στο εμπόριο κυκλοφορούν παγκρεατικές λιπάσες με δραστηριότητα 2,0 έως 10 μονάδων ανά mg ενζύμου.)

- 4.6. Ρυθμιστικό διάλυμα τρις-υδροξυ-μεθυλαμινομεθανίου: υδατικό διάλυμα 1 M, του οποίου το pH ρυθμίζεται στην τιμή 8 (ποτενσιομετρικός έλεγχος) με πυκνό HCl (1:1 κ.ό.)

- 4.7. Χολικό νάτριο ενζυματικής καθαρότητας, υδατικό διάλυμα 0,1 % (το διάλυμα αυτό πρέπει να χρησιμοποιείται εντός 15 ημερών από την παρασκευή του)

- 4.8. Χλωριούχο ασβέστιο, υδατικό διάλυμα 22 %

- 4.9. Διαιθυλαιθέρας για χρωματογραφία

- 4.10. Διαλύτης ανάπτυξης: μείγμα η-εξανίου και διαιθυλαιθέρα 87:13 (κ.ό.)

- 4.11. Υδροξείδιο του νατρίου, διάλυμα 12 % κ.β.

- 4.12. Φαινολοφθαλεΐνη, διάλυμα 1 % σε αιθανόλη

- 4.13. Φέρον αέριο: υδρογόνο ή ήλιο για αέρια χρωματογραφία

- 4.14. Βοηθητικά αέρια: – υδρογόνο, καθαρότητας τουλάχιστον 99 %, απαλλαγμένο υγρασίας και οργανικών ουσιών – και αέρας της ίδιας καθαρότητας, για αέρια χρωματογραφία

- 4.15. Αντιδραστήριο σιλικώσεως: μείγμα πυριδίνης-εξαμεθυλοδισιλαζανίου-τριμεθυλοχλωροσιλανίου 9:3:1 (κ.ό.) (Στο εμπόριο κυκλοφορούν έτοιμα διαλύματα. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και άλλα αντιδραστήρια σιλικώσεως, όπως π.χ. δις-τριμεθυλοσιλοτριφθορακεταμίδιο + 1 % τριμεθυλοχλωροσιλάνιο, αραιωμένα με ίσο όγκο άνυδρης πυριδίνης.)

- 4.16. Ουσίες αναφοράς: καθαρά μονογλυκερίδια ή μείγματα μονογλυκεριδίων γνωστής εκατοστιαίας σύστασης, ανάλογης με τη σύσταση του δείγματος.

5. **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**5.1. **Προετοιμασία του δείγματος**

- 5.1.1. Τα έλαια με περιεκτικότητα σε ελεύθερα οξέα κάτω του 3 % δεν χρειάζεται να εξουδετερώνονται πριν από τη χρωματογραφία σε στήλη silica gel. Τα έλαια των οποίων η περιεκτικότητα σε ελεύθερα οξέα υπερβαίνει το 3 % πρέπει να εξουδετερώνονται σύμφωνα με το σημείο 5.1.1.1.

▼ **M21**

- 5.1.1.1. Στη διαχωριστική χοάνη των 1 000 ml (3.13) φέρονται 50 g ελαίου και 200 ml n-εξανίου. Προστίθενται 100 ml ισοπροπανόλης και ποσότητα διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 12 % (4.11) η οποία αντιστοιχεί στην περιεκτικότητα του ελαίου σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, προσανζυμένη κατά 5 %. Το σύνολο αναδεύεται ζωηρά επί ένα λεπτό, προστίθενται 100 ml απεσταγμένου νερού, αναδεύεται πάλι και αφήνεται σε ηρεμία.

Μετά το διαχωρισμό, απορρίπτεται η κατώτερη στιβάδα που περιέχει τους σάπωνες και απομακρύνονται οι πιθανές ενδιάμεσες στιβάδες (βλέννες και αδιάλυτες ουσίες). Το εξανικό διάλυμα του εξουδετερωμένου ελαίου εκπλύνεται με διαδοχικές δόσεις 50-60 ml διαλύματος ισοπροπανόλης σε νερό 1:1 (κ.ό.) (4.4) μέχρι να εξαφανιστεί το ρόδινο χρώμα της φαινολοφθαλείνης.

Απομακρύνεται το μεγαλύτερο μέρος του εξανίου με απόσταξη υπό κενό (χρησιμοποιείται π.χ. περιστροφικός εξατμιστήρας) και το έλαιο μεταγγίζεται σε σφαιρική φιάλη των 100 ml (3.5) και ξηραίνεται υπό κενό μέχρι να απομακρυνθεί τελείως ο διαλύτης.

Μετά το τέλος της εργασίας αυτής, η οξύτητα του ελαίου πρέπει να είναι μικρότερη από 0,5 %.

- 5.1.2. Σε φιάλη Erlenmeyer των 25 ml (3.1) φέρεται 1,0 g του ανωτέρω παρασκευάσματος ελαίου και διαλύεται σε 10 ml μείγματος ανάπτυξης (4.10). Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία τουλάχιστον επί 15 λεπτά πριν από τη χρωματογραφία σε στήλη silica gel.

Εάν το διάλυμα είναι θολό, φυγοκεντρείται ώστε να εξασφαλιστούν άριστες συνθήκες για τη χρωματογραφία. (Μπορούν να χρησιμοποιηθούν έτοιμες φύσιγγες silica gel SPE των 500 mg).

- 5.1.3. *Ετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης*

Προστίθενται στη στήλη (3.3) περίπου 30 ml διαλύτη ανάπτυξης (4.10). Με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου εισάγεται στο κατώτερο τμήμα της ένα τεμάχιο βάμβακα και πιέζεται για να αφαιρεθεί ο αέρας.

Σε ποτήρι ζέσεως παρασκευάζεται εναιώρημα 25 g silica gel (4.1) σε περίπου 80 ml διαλύτη ανάπτυξης και προστίθεται στη στήλη με τη βοήθεια διαχωριστικής χοάνης.

Εξακριβώνεται ότι έχει εισέλθει στη στήλη το σύνολο του silica gel. Μετά από έκπλυση με τον διαλύτη ανάπτυξης (4.10), ανοίγεται η στρόφιγγα της στήλης και το υγρό αφήνεται να εκρεύσει έως ότου η στάθμη του να βρίσκεται περίπου 2 mm πάνω από το silica gel.

- 5.1.4. *Χρωματογραφία στήλης*

Σε φιάλη Erlenmeyer των 25 ml (3.1), ζυγίζεται ακριβώς 1,0 g δείγματος που έχει παρασκευαστεί σύμφωνα με το σημείο 5.1.

Το δείγμα διαλύεται σε 10 ml διαλύτη ανάπτυξης (4.10). Το διάλυμα προστίθεται στη χρωματογραφική στήλη που έχει ετοιμαστεί σύμφωνα με το σημείο 5.1.3, ενώ λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην ανακινηθεί η επιφάνεια της στήλης.

Ανοίγεται η στρόφιγγα και το διάλυμα του δείγματος αφήνεται να εκρεύσει έως ότου η στάθμη του εξισωθεί με τη στάθμη του silica gel. Ακολουθεί ανάπτυξη με 150 ml διαλύματος ανάπτυξης. Η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται σε 2 ml/min (έτσι ώστε τα 150 ml να εκρεύσουν από τη στήλη εντός 60-70 λεπτών περίπου).

Το έκλουσμα συλλέγεται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη των 250 ml. Εξατμίζεται ο διαλύτης υπό κενό και απομακρύνονται τα τελευταία ίχνη του με διαβίβαση ρεύματος αζώτου.

Ζυγίζεται η σφαιρική φιάλη και υπολογίζεται το εκχύλισμα που συλλέχθηκε.

▼ **M21**

[Σε περίπτωση χρήσης έτοιμων φυσίγγων silica gel SPE, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Μετά την ετοιμασία των φυσίγγων με 3 ml n-εξανίου, προστίθεται σε αυτές 1 ml διαλύματος (5.1.2).

Μετά τη διήθηση του διαλύματος, ακολουθεί ανάπτυξη με 4 ml μείγματος η-εξανίου και διαιθυλαιθέρα 9:1 (κ.ό.).

Το έκλουσμα συλλέγεται σε σωλήνα των 10 ml και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού με διαβίβαση ρεύματος αζώτου.

Το ξηρό υπόλειμμα υφίσταται την επίδραση παγκρεατικής λιπάσης (5.2). Είναι θεμελιώδους σημασίας η εξακρίβωση της σύστασης σε λιπαρά οξέα πριν και μετά τη διέλευση από τη φύσιγγα SPE].

5.2. Υδρόλυση με παγκρεατική λιπάση

5.2.1. Στον σωλήνα φυγοκέντρου ζυγίζεται 0,1 g ελαίου που έχει παρασκευαστεί σύμφωνα με το σημείο 5.1. Προστίθενται 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος (4.6), 0,5 ml διαλύματος χολικού νατρίου (4.7) και 0,2 ml διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου με καλή ανάδευση μετά από κάθε προσθήκη. Κλείνεται ο σωλήνας με το εσφυρισμένο πώμα και τοποθετείται στον θερμοστάτη στους $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2. Προστίθενται 20 mg λιπάσης, το σύνολο αναδεύεται επιμελώς (χωρίς να διαβραχεί το πώμα) και τοποθετείται στον θερμοστάτη επί 2 λεπτά ακριβώς. Στη συνέχεια ο σωλήνας αποσύρεται, ανακινείται ζωηρά επί 1 λεπτό ακριβώς και αφήνεται να ψυχθεί.

5.2.3. Προστίθεται 1 ml διαιθυλαιθέρα, ο σωλήνας πωματίζεται και το αιθερικό διάλυμα ανακινείται ζωηρά, φυγοκεντρείται και μεταφέρεται με μικροσύριγγα σε καθαρό και στεγνό σωλήνα.

5.3. Παρασκευή των σιλυλοπαραγώγων και προετοιμασία της αέριας χρωματογραφίας

5.3.1. Σε σωλήνα με κωνικό πυθμένα των 10 ml φέρονται με μικροσύριγγα 100 μl διαλύματος (5.2.3).

5.3.2. Απομακρύνεται ο διαλύτης με τη διαβίβαση ελαφρού ρεύματος, αζώτου, προστίθενται 200 μl αντιδραστηρίου σιλυλίωσης (4.15) και ο σωλήνας πωματίζεται και αφήνεται σε ηρεμία επί 20 λεπτά.

5.3.3. Μετά από 20 λεπτά, προστίθενται 1 έως 5 ml n-εξανίου (ανάλογα με τις συνθήκες χρωματογραφίας): το διάλυμα που προκύπτει είναι έτοιμο για αέρια χρωματογραφία.

5.4. Αέρια χρωματογραφία

Οι συνθήκες εργασίας είναι οι ακόλουθες:

— θερμοκρασία του συστήματος έγχυσης («on column») μικρότερη από το σημείο ζέσεως του διαλύτη (68 °C),

— θερμοκρασία του ανιχνευτή: 350 °C,

— θερμοκρασία της στήλης: προγραμματισμός της θερμοκρασίας του κλιβάνου: 60 °C επί 1 λεπτό, αύξηση 15 °C ανά λεπτό μέχρι τους 180 °C και έπειτα 5 °C ανά λεπτό μέχρι τους 340 °C, κατόπιν 340 °C επί 13 λεπτά,

— φέρον αέριο: υδρογόνο ή ήλιο, ρυθμισμένο στην κατάλληλη γραμμική ταχύτητα, ώστε να επιτευχθεί η διαχωριστική ικανότητα που αποτυπώνεται στο σχήμα 1. Ο χρόνος κατακράτησης του τριγλυκεριδίου C₅₄ πρέπει να είναι 40 ± 5 λεπτά (βλέπε σχήμα 2). (Οι ανωτέρω συνθήκες εργασίας προτείνονται ενδεικτικά. Κάθε τεχνικός οφείλει να τις βελτιστοποιεί για να επιτύχει την επιθυμητή διαχωριστική ικανότητα. Η κορυφή που αντιστοιχεί στην 2-μονοπαλμιτίνη πρέπει να έχει ελάχιστο ύψος 10 % της κλίμακας του καταγραφέα.),

▼ M21

— εγγεόμενη ποσότητα ουσίας: 0,5-1 μl του n-εξανικού διαλύματος (5 ml) (5.3.3).

5.4.1. *Ταυτοποίηση των κορυφών*

Τα επιμέρους μονογλυκερίδια ταυτοποιούνται βάσει των λαμβανόμενων χρόνων κατακράτησης και με σύγκριση με τους χρόνους κατακράτησης προτύπων μειγμάτων μονογλυκεριδίων, που αναλύθηκαν στις ίδιες συνθήκες.

5.4.2. *Ποσοτικός προσδιορισμός*

Το εμβαδόν κάθε κορυφής υπολογίζεται με ηλεκτρονικό ολοκληρωτή.

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η εκατοστιαία αναλογία 2-μονοπαλμιτίνης υπολογίζεται από τον λόγο του εμβαδού της αντίστοιχης κορυφής προς το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών όλων των μονογλυκεριδίων (βλέπε σχήμα 2), σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{glyceryl monopalmitate (\%)}: \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

όπου:

A_x = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στη 2-μονοπαλμιτίνη,

ΣA = το άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών που αντιστοιχούν σε μονογλυκερίδια.

Το αποτέλεσμα πρέπει να εκφράζεται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

7. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

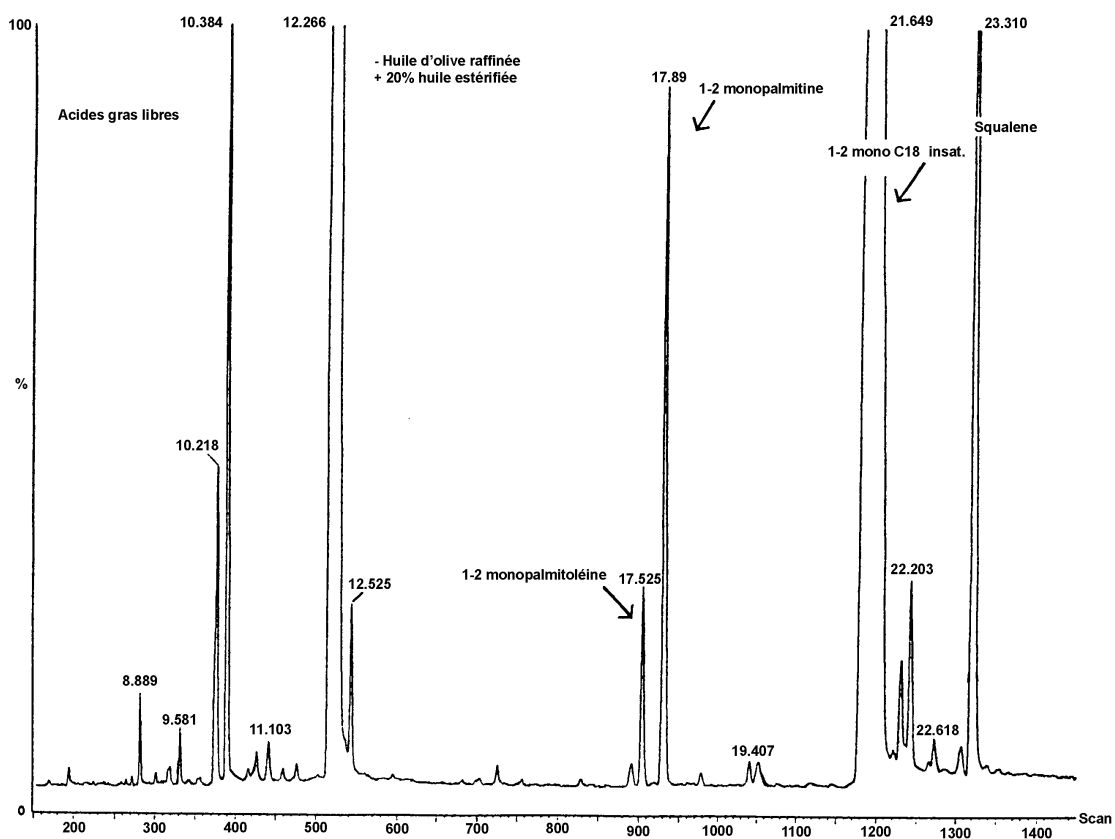
Στην έκθεση της ανάλυσης θα πρέπει να αναφέρονται τα εξής:

- παραπομπή στη παρούσα μέθοδο,
- κάθε στοιχείο απαραίτητο για την πλήρη ταυτοποίηση του δείγματος,
- το αποτέλεσμα της ανάλυσης,
- κάθε παρέκκλιση από την παρούσα μέθοδο, ανεξαρτήτως του εάν έχει αποφασιστεί από τα ενδιαφερόμενα μέρη ή οφείλεται σε άλλους λόγους,
- στοιχεία ταυτότητας του εργαστηρίου, ημερομηνία της ανάλυσης και υπογραφή των υπευθύνων γι' αυτή.

▼ M21

Σχήμα 1

Χρωματογράφημα των προϊόντων της αντίδρασης σιλυλίωσης που προέκυψαν από την επίδραση λιπάσης σε εξευγενισμένο ελαιόλαδο, στο οποίο είχε προστεθεί 20 % εστεροποιημένο έλαιο (100 %)



Key: «acides gras libres» = free fatty acids; «Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée» = refined olive oil + 20 % esterified oil; «1-2 monopalmitoléine» = 1-2 monopalmitolein; «1-2 mono C₁₈ insat.» = unsaturated 1-2 mono C₁₈

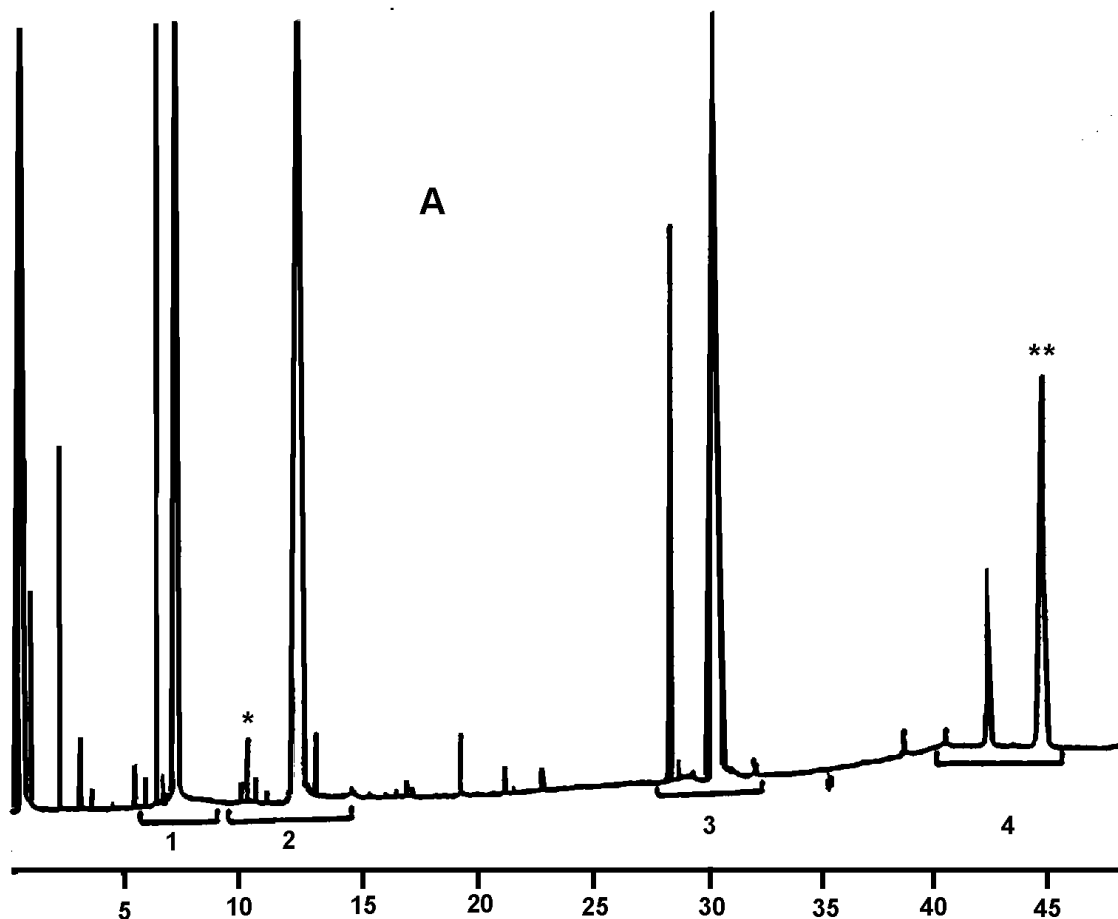
▼ M21

Σχήμα 2

Χρωματογράφημα:

A) μη εστεροποιημένου ελαιόλαδου, μετά από την επίδραση λιπάσης και από σιλωλίωση· στις συνθήκες αυτές (τριχοειδής στήλη 8-12 m), το κλάσμα των κηρών εκλούεται ταυτόχρονα με το κλάσμα των διγλυκεριδίων ή λίγο αργότερα.

Μετά την επίδραση της λιπάσης, η περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 15 %



Υπόμνημα:

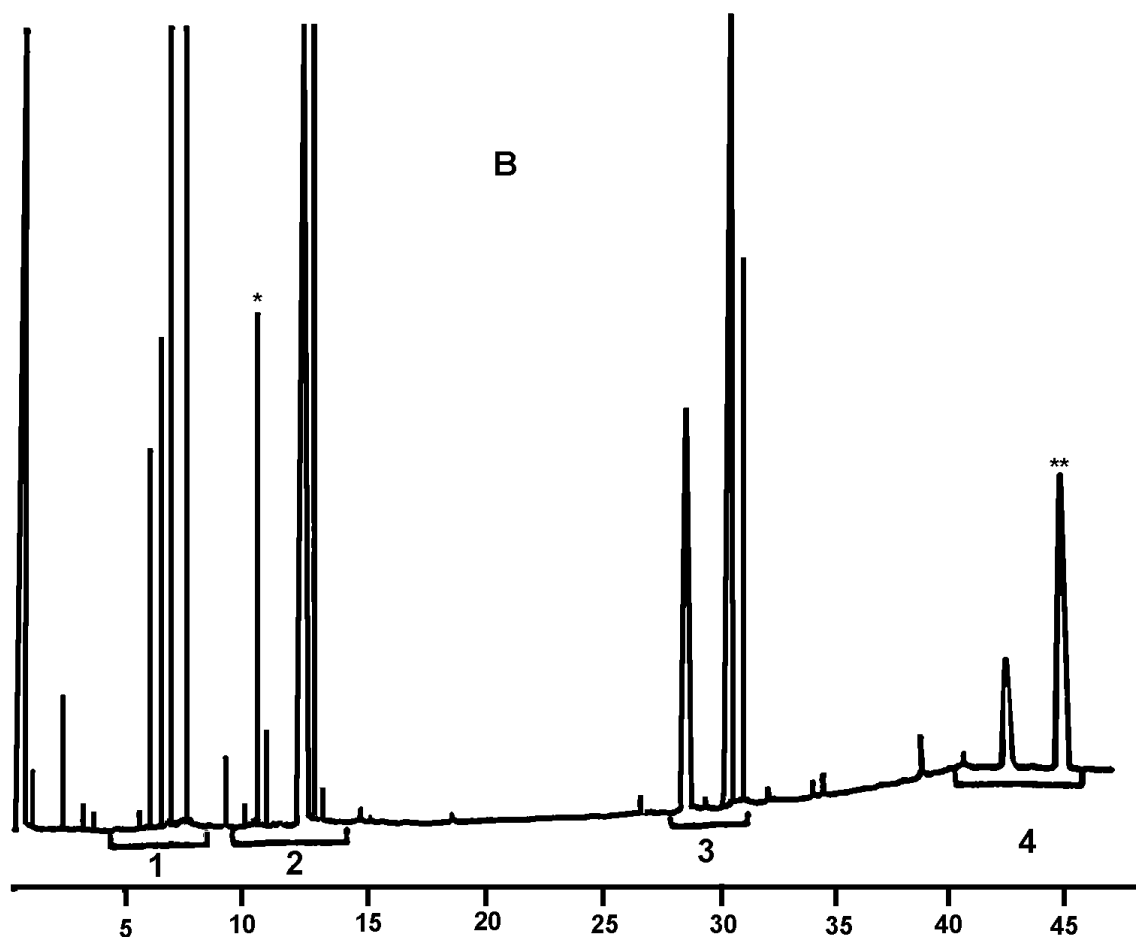
- 1 = Ελεύθερα λιπαρά οξέα
- 2 = Μονογλυκερίδια
- 3 = Διγλυκερίδια
- 4 = Τριγλυκερίδια
- * = 2-μονοπαλμτίνη
- ** = Τριγλυκερίδιο C₅₄

▼ **M21**

Χρωματογράφημα:

B) εστεροποιημένου ελαίου, μετά από την επίδραση λιπάσης και από σιλυλίωση· στις συνθήκες αυτές (τριχοειδής στήλη 8-12 m), το κλάσμα των κηρών εκλύεται ταυτόχρονα με το κλάσμα των διγλυκεριδίων ή λίγο αργότερα.

Μετά την επίδραση της λιπάσης, η περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 15 %.



Υπόμνημα:

- 1 = Ελεύθερα λιπαρά οξέα
- 2 = Μονογλυκερίδια
- 3 = Διγλυκερίδια
- 4 = Τριγλυκερίδια
- * = 2-μονοπαλμιτίνη
- ** = Τριγλυκερίδιο C₅₄

▼ **M21**

8. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

Σημείωση 1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ

Στο εμπόριο κυκλοφορούν λιπάσες ικανοποιητικής δραστηριότητας. Είναι επίσης δυνατή η εργαστηριακή παρασκευή τους ως εξής:

Ψύχονται 5 kg νωπού παγκρέατος χοίρου στους 0 °C. Το πάγκρεας απαλλάσσεται από το στερεό λίπος και τον συνδετικό ιστό που το περιβάλλουν και αλέθεται σε μικροτεμαχιστή με λεπίδες μέχρι να ληφθεί ρευστός πολτός. Ο πολτός αυτός αναδεύεται επί 4-6 ώρες με 2,5 λίτρα άνυδρης ακετόνης και κατόπιν φυγοκεντρείται. Το υπόλειμμα εκχυλίζεται τρεις φορές ακόμα με τον ίδιο όγκο άνυδρης ακετόνης και, έπειτα, δύο φορές με μείγμα ακετόνης και διαιθυλαιθέρα 1:1 (κ.ό.) και δύο φορές με διαιθυλαιθέρα.

Το υπόλειμμα ξηραίνεται υπό κενό επί 48 ώρες για να ληφθεί σταθερή σκόνη, η οποία διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα στο ψυγείο, προφυλαγμένη από την υγρασία.

Σημείωση 2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ

Παρασκευάζεται γαλάκτωμα ελαιολάδου ως εξής:

Αναδεύεται σε αναμικτήρα επί 10 λεπτά μείγμα 165 ml διαλύματος αραβικού κόμμεως 100 g/l, 15 g θρυμματισμένου πάγου και 20 ml εξουδετερωμένου ελαιολάδου.

Σε ποτήρι ζέσεως των 50 ml εισάγονται διαδοχικά 10 ml του εν λόγω γαλακτώματος, 0,3 ml διαλύματος χολικού νατρίου 0,2 g/ml και 20 ml απεσταγμένου νερού.

Το ποτήρι τοποθετείται σε θερμοστάτη, ρυθμισμένο στους 37 °C, και εισάγονται τα ηλεκτρόδια του πεχάμετρου και ο ελικοειδής αναδευτήρας.

Προστίθεται στάγδην, με προχοΐδα, διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0,1 N μέχρι να επιτευχθεί pH 8,3.

Προστίθεται μια ποσότητα αιωρήματος σκόνης λιπάσης σε νερό (0,1 g/ml λιπάσης). Όταν η ένδειξη του πεχάμετρου είναι 8,3, τίθεται σε λειτουργία το χρονόμετρο και προστίθεται στάγδην διάλυμα υδροξειδίου νατρίου με το ρυθμό που απαιτείται για να διατηρηθεί το pH στην τιμή 8,3. Σημειώνεται ανά λεπτό ο όγκος διαλύματος που καταναλώνεται.

Σχεδιάζεται γραφική παράσταση των δεδομένων σε ορθογώνιο σύστημα αξόνων, με τετμημένη τους χρόνους και τεταγμένη τα ml αλκαλικού διαλύματος 0,1 N που καταναλώθηκαν για να διατηρηθεί το pH σταθερό. Πρέπει να προκύπτει γραμμική καμπύλη.

Η δραστηριότητα της λιπάσης, μετρούμενη σε μονάδες λιπάσης ανά mg, παρέχεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

A = η δραστηριότητα σε μονάδες λιπάσης/mg,

V = τα χιλιοστόλιτρα διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 0,1 N που καταναλώνονται ανά λεπτό (υπολογιζόμενα από την καμπύλη),

N = η κανονικότητα του διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου,

m = η μάζα της ελεγχόμενης λιπάσης, σε mg.

Ως μονάδα λιπάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που ελευθερώνει 10 μικρογραμμοϊσοδύναμα οξέος ανά λεπτό.

▼ **M20**

▼ M25

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IX

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με τη φασματοφωτομετρική εξέταση υπεριώδους είναι δυνατόν να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα μιας λιπαρής ύλης, την κατάσταση διατήρησής της και τις μεταβολές που έχει υποστεί με τεχνολογικές διεργασίες.

Η απορρόφηση στα μήκη κύματος που καθορίζονται στη μέθοδο οφείλεται στην παρουσία συζυγιακών διενίων και τριενίων. Η εν λόγω απορρόφηση εκφράζεται ως ειδική απόσβεση $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (η απόσβεση διαλύματος 1 % της λιπαρής ύλης στον καθοριζόμενο διαλύτη, με πάχος 1 cm), η οποία δηλώνεται κατά σύμβαση με το σύμβολο K (αναφέρεται επίσης ως «συντελεστής απόσβεσης»).

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Στη μέθοδο περιγράφεται η διαδικασία φασματοφωτομετρικής εξέτασης του ελαιολάδου (όπως αυτό περιγράφεται στο προσάρτημα) στο υπεριώδες τμήμα του φάσματος.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξεταζόμενη λιπαρή ύλη διαλύεται στον απαιτούμενο διαλύτη και, στη συνέχεια, μετράται η απόσβεση του διαλύματος στα καθορισμένα μήκη κύματος έναντι του καθαρού διαλύτη. Υπολογίζεται η ειδική απόσβεση από τις ενδείξεις του φασματοφωτομέτρου. Υπολογίζεται η ειδική απορρόφηση σε μήκη κύματος 232 nm και 268 nm σε ισοοκτάνιο ή 232 nm και 270 nm σε κυκλοεξάνιο, για συγκέντρωση 1 g ανά 100 ml και με κυψελίδα των 10 mm.

3. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- 3.1. Φασματοφωτόμετρο για τη μέτρηση της απόσβεσης στο υπεριώδες, σε μήκη κύματος μεταξύ 220 και 360 nm, με δυνατότητα ένδειξης ανά νανομετρική μονάδα. Συνιστάται ο κατωτέρω έλεγχος των κλιμάκων μήκους κύματος και απορρόφησης του φασματοφωτομέτρου, πριν από τη χρήση του.

- 3.1.1. *Κλίμακα μήκους κύματος*: Η κλίμακα αυτή είναι δυνατόν να ελεγχθεί με τη χρήση υλικού αναφοράς, το οποίο συνίσταται σε γυάλινο οπτικό φίλτρο που περιέχει οξείδιο του ολμίου, μια ένωση με διακριτές φασματικές ζώνες απορρόφησης. Το υλικό αναφοράς είναι σχεδιασμένο για τον έλεγχο και τη βαθμονόμηση των κλιμάκων μήκους κύματος των φασματοφωτομέτρων ορατού και υπεριώδους με μέγιστο ονομαστικό εύρος φασματικής ζώνης 5 nm. Το γυάλινο φίλτρο ολμίου μετράται στη λειτουργία απορρόφησης του οργάνου, έναντι αέρα ως τυφλού, στην περιοχή μηκών κύματος 640 έως 240 nm. Για κάθε εύρος φασματικής ζώνης (0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,00 – 1,50 – 2,00 και 3,00) διορθώνεται η γραμμική βάσης με κενό υποδοχέα κυψελίδας. Τα μήκη κύματος του εύρους φασματικής ζώνης παρατίθενται στο πιστοποιητικό του υλικού αναφοράς που αναφέρεται στο πρότυπο ISO 3656.

- 3.1.2. *Κλίμακα απορρόφησης*: Η κλίμακα αυτή είναι δυνατόν να ελεγχθεί με τη χρήση υλικού αναφοράς, το οποίο συνίσταται σε τέσσερα διαλύματα διχρωμικού καλίου σε υπερχλωρικό οξύ, τοποθετημένα σε τέσσερις ερμητικά σφραγισμένες κυψελίδες υπεριώδους από χαλαζία, για τη μέτρηση της γραμμικότητας και της φωτομετρικής ακρίβειας στο υπεριώδες τμήμα του φάσματος. Οι κυψελίδες που έχουν πληρωθεί με διχρωμικό κάλιο (40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml και 100 mg/ml) μετρώνται έναντι υπερχλωρικού οξέος ως τυφλού. Οι τιμές καθαρής απορρόφησης παρατίθενται στο πιστοποιητικό του υλικού αναφοράς που αναφέρεται στο πρότυπο ISO 3656.

- 3.2. Ορθογώνιες κυψελίδες από χαλαζία με καλύμματα, οπτικής διαδρομής 1 cm. Όταν οι κυψελίδες πληρούνται με νερό ή άλλον κατάλληλο διαλύτη, οι μεταξύ τους διαφορές ως προς την απόσβεση δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τη 0,01 μονάδα.

▼ **M25**

- 3.3. Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml.
- 3.4. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ενδείξεων 0,0001 g.
4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Εκτός αντίθετων υποδείξεων, χρησιμοποιούνται μόνο αντιδραστήρια αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας.

Διαλύτης: Ισοοκτάνιο (2,2,4-τριμεθυλοπεντάνιο), για τις μετρήσεις στα 232 nm και 268 nm, ή κυκλοεξάνιο, για τις μετρήσεις στα 232 nm και 270 nm, με απορρόφηση μικρότερη από 0,12 στα 232 nm και μικρότερη από 0,05 στα 250 nm έναντι αποσταγμένου νερού, μετρούμενη με κυψελίδα των 10 mm.

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- 5.1. Το εξεταζόμενο δείγμα πρέπει να είναι απόλυτα ομοιογενές και απαλλαγμένο από πιθανολογούμενες προσμείξεις. Τα έλαια που είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πρέπει να διηθούνται με χάρτινο ηθμό σε θερμοκρασία 30 °C περίπου, ενώ οι στερεές λιπαρές ύλες πρέπει να ομοιογενοποιούνται και να διηθούνται σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει κατά περισσότερο από 10 °C το σημείο τήξης.
- 5.2. Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml ζυγίζονται επακριβώς (με ακρίβεια 1 mg) περίπου 0,25 g του προετοιμασμένου με τον τρόπο αυτό δείγματος, συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με τον καθορισμένο διαλύτη και το μείγμα ομοιογενοποιείται. Το διάλυμα που προκύπτει πρέπει να είναι τελείως διαυγές. Εάν παρατηρηθεί γαλακτώδης ιριδισμός ή θολερότητα, το διάλυμα διηθείται ταχέως με χάρτινο ηθμό.
- 5.3. Πληρούνται με το διάλυμα αυτό μια κυψελίδα από χαλαζία και μετράται η απόσβεση σε κατάλληλο μήκος κύματος μεταξύ 232 και 276 nm έναντι του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε.

Οι καταγραφόμενες τιμές απόσβεσης πρέπει να περικλείονται στην περιοχή 0,1 έως 0,8. Σε αντίθετη περίπτωση, πρέπει να επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις με τη χρήση πυκνότερου ή αραιότερου διαλύματος, αναλόγως.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Ενδέχεται να μην χρειάζεται μέτρηση της απορρόφησης σε ολόκληρο το εύρος μηκών κύματος.

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- 6.1. Καταγράφονται οι τιμές ειδικής απόσβεσης (συντελεστές απόσβεσης) στα διάφορα μήκη κύματος, οι οποίες υπολογίζονται ως εξής:

$$K_{\lambda} = \left(\frac{E_{\lambda}}{c \cdot s} \right)$$

όπου:

K_{λ} = ειδική απόσβεση σε μήκος κύματος λ ,

E_{λ} = μετρούμενη απόσβεση σε μήκος κύματος λ ,

c = συγκέντρωση του διαλύματος, σε g/100 ml,

s = πάχος της κυψελίδας από χαλαζία, σε cm.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία.

6.2. Μεταβλητότητα της ειδικής απόσβεσης (ΔK)

Η φασματοφωτομετρική ανάλυση ελαιολάδου σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο που προβλέπεται στην ενωσιακή νομοθεσία περιλαμβάνει επίσης προσδιορισμό της μεταβλητότητας της απόλυτης τιμής ειδικής απόσβεσης (ΔK), η οποία προκύπτει από την εξίσωση:

$$\Delta K = |K_m - \left(\frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2} \right)|$$

όπου K_m είναι η ειδική απόσβεση σε μήκος κύματος m , ήτοι το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση και εξαρτάται από τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη: 270 nm για το κυκλοεξάνιο και 268 nm για το ισοοκτάνιο.

Προσάρτημα

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Κατηγορία		Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME) και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAEE)	Οξύτητα (%) (*)	Αριθμός υπεροξειδίων mEq 02/kg (*)	Κηροί mg/kg (**)	Μονοπαλμιτικό 2-γλυκερύλιο (%)	Στιγμα-σταδιένιο mg/kg (1)	Διαφορά μεταξύ ECN42 (HPLC) και ECN42 (θεωρητικός υπολογισμός)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*) (K ₂₇₀ ή K ₂₆₈ (5))	ΔK (*) (5)	Οργανοληπτική εξέταση Διάμεσος των ελαττωμάτων (Md) (*)	Οργανοληπτική εξέταση Διάμεσος του φρουτώδους (Mf) (*)
1.	Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg ή 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg και (FAEE/FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % ≤ 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
						1,0 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % > 14 %							
2.	Παρθένο ελαιόλαδο	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % ≤ 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
						≤ 1,0 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % > 14 %							
3.	Ελαιόλαδο λαμπάντε	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (2)	—
						≤ 1,1 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % > 14 %							
4.	Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
						≤ 1,1 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % > 14 %							

Κατηγορία		Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME) και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAEE)	Οξύτητα (%) (*)	Αριθμός υπεροξειδίων mEq 02/kg (*)	Κηροί mg/kg (**)	Μονοπαλμιτικό 2-γλυκερύλιο (%)	Στιγμα-σταδιένιο mg/kg ⁽¹⁾	Διαφορά μεταξύ ECN42 (HPLC) και ECN42 (θεωρητικός υπολογισμός)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*) (K ₂₇₀ ή K ₂₆₈ ⁽⁵⁾)	ΔK (*) ⁽⁵⁾	Οργανοληπτική εξέταση Διάμεσος των ελαττωμάτων (Md) (*)	Οργανοληπτική εξέταση Διάμεσος του φρουτώδους (Mf) (*)
5.	Σύνθετο ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
						≤ 1,0 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % > 14 %							
6.	Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	—	—	—	> 350 ⁽⁴⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7.	Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8.	Πυρηνέλαιο	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

⁽¹⁾ Άθροισμα των ισομερών που θα μπορούσαν να διαχωριστούν (ή όχι) με τριχοειδή στήλη.

⁽²⁾ Ή όταν η διάμεσος των ελαττωμάτων είναι μικρότερη ή ίση με 3,5 και η διάμεσος του φρουτώδους ισούται με 0.

⁽³⁾ Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ελαιόλαδα λαμπάντε, εάν η περιεκτικότητα σε ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι μικρότερη ή ίση με 350 mg/kg ή εάν η εκατοστιαία αναλογία ερυθροδιόλης και ουβαόλης είναι μικρότερη ή ίση με 3,5 %.

⁽⁴⁾ Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ακατέργαστα πυρηνέλαια, εάν η περιεκτικότητα σε ολικές αλειφατικές αλκοόλες υπερβαίνει τα 350 mg/kg και εάν η εκατοστιαία αναλογία ερυθροδιόλης και ουβαόλης υπερβαίνει το 3,5 %.

⁽⁵⁾ K 270 εάν ο διαλύτης είναι κυκλοεξάνιο, K₂₆₈ εάν είναι ισοοκτάνιο.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Χ «Α»

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΔΙ' ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Το παρόν διεθνές πρότυπο παρέχει γενικές οδηγίες για την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας, με κοινές ►C1 (packed) ◄ ή τριχοειδείς στήλες, στον προσδιορισμό της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης μείγματος μεθυλεστέρων, οι οποίοι λαμβάνονται από λιπαρά οξέα με τη μέθοδο που καθορίζεται στο παράρτημα ΧΒ.

Η παρούσα μέθοδος δεν έχει εφαρμογή στα πολυμερισμένα λιπαρά οξέα.

2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

2.1. Φέρον αέριο

Αδρανές αέριο (άζωτο, ήλιο, αργό, υδρογόνο, κ.λπ.) που έχει πλήρως ξηρανθεί και περιέχει λιγότερο από 10 mg/kg οξυγόνου.

Σημείωση 1: Το υδρογόνο που χρησιμοποιείται ως φέρον αέριο μόνο με τριχοειδείς στήλες, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα διπλάσια ταχύτητα ανάλυσης, αλλά είναι επικίνδυνο. Διατίθενται συστήματα ασφαλείας.

2.2. Βοηθητικά αέρια

2.2.1. Υδρογόνο (καθαρότητας 99,9 %), απαλλαγμένο από οργανικές προσμείξεις.

2.2.2. Αέρας ή οξυγόνο χωρίς ►C1 οργανικές ◄ προσμείξεις.

2.3. Πρότυπο αναφοράς

Μείγμα μεθυλεστέρων ►C1 καθαρών ◄ λιπαρών οξέων ή μεθυλεστερές λιπών γνωστής σύστασης, κατά προτίμηση ανάλογης με τη σύσταση της προς ανάλυση λιπαρής ύλης.

Λαμβάνεται πρόνοια ώστε να παρεμποδιστεί η οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Οι παρεχόμενες υποδείξεις αφορούν το συνήθη εργαστηριακό εξοπλισμό αέριας χρωματογραφίας, με χρήση κοινών ή/και τριχοειδών στήλων και ανιχνευτή ►C1 ιονιζούσης φλογός ◄. Οποιοσδήποτε εξοπλισμός, με τον οποίο επιτυγχάνονται η αποδοτικότητα και η διακριτική ικανότητα που καθορίζονται στο σημείο 4.1.2, είναι κατάλληλος.

3.1. Αέριος χρωματογράφος

Ο αέριος χρωματογράφος αποτελείται από τα παρακάτω ►C1 τμήματα ◄:

3.1.1. Σύστημα έγχυσης του δείγματος

Χρησιμοποιείται σύστημα έγχυσης του δείγματος

α) είτε με κοινές στήλες, με το λιγότερο δυνατό μη ►C1 ωφέλιμο ◄ χώρο (στην περίπτωση αυτή, το σύστημα έγχυσης πρέπει να μπορεί να θερμαίνεται σε θερμοκρασία 20 °C έως 50 °C υψηλότερη από τη θερμοκρασία της στήλης)

β) είτε με τριχοειδείς στήλες, οπότε το σύστημα έγχυσης πρέπει να είναι ειδικά σχεδιασμένο για χρήση με στήλες του είδους αυτού. Μπορεί να είναι σύστημα με οπή (split) ή σύστημα έγχυσης πάνω στη στήλη χωρίς οπή (splitless).

▼B

Σημείωση 2: Εφόσον δεν υπάρχουν στο δείγμα λιπαρά οξέα με λιγότερα από 16 άτομα άνθρακα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σύστημα έγχυσης κινούμενης βελόνης.

3.1.2. Κλίβανος

Ο κλίβανος πρέπει να θερμαίνει τη στήλη σε θερμοκρασία τουλάχιστον 268 °C και να διατηρεί την επιθυμητή θερμοκρασία με ακρίβεια ± 1 °C, προκειμένου για κοινές στήλες, ή $\pm 0,1$ °C προκειμένου για τριχοειδείς. Η δεύτερη απαίτηση έχει ιδιαίτερη σημασία, όταν χρησιμοποιείται στήλη από συντετηγμένο διοξείδιο του ►C1 πυριτίου ◄.

Η χρήση προγραμματισμού θερμοκρασίας για τη θέρμανση συνιστάται σε όλες τις περιπτώσεις, αλλά ιδίως προκειμένου για λιπαρά οξέα με λιγότερα από 16 άτομα άνθρακα.

3.1.3. Κοινή στήλη ►C1 (packed column) ◄

3.1.3.1. Στήλη κατασκευασμένη από υλικό υδρανές σε σχέση με τις προς ανάλυση ουσίες (δηλαδή από γυαλί ή ανοξείδωτο χάλυβα) με τις ακόλουθες διαστάσεις:

α) μήκος: 1 έως 3 μέτρα. Παρουσία λιπαρών οξέων με μακρά άλυσσο (άνω του C₂₀), θα πρέπει να χρησιμοποιείται σχετικά κοντή στήλη. Για την ανάλυση οξέων με 4 ή 6 άτομα άνθρακα, συνιστάται η χρήση στήλης μήκους 2 μέτρων.

β) εσωτερική διάμετρος: 2 έως 4 mm.

Σημείωση 3: Με τις στήλες από ανοξείδωτο χάλυβα είναι δυνατόν να επέλθει αποσύνθεση των πολυακόρεστων συστατικών με περισσότερους από τρεις διπλούς δεσμούς.

Σημείωση 4: Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σύστημα διπλών στηλών.

3.1.3.2. Υλικό πληρώσεως της στήλης, που αποτελείται από τα ακόλουθα στοιχεία:

α) *υπόστρωμα:* Γη διατόμων, που έχει υποβληθεί σε έκπλυση με οξύ και σύλανοποίηση ή άλλο κατάλληλο αδρανές υπόστρωμα, με στενό εύρος μεγέθους κόκκων (εύρος 25 μm μεταξύ των οριακών τιμών 125 μm και 200 μm): το μέσο μέγεθος κόκκων εξαρτάται από την εσωτερική διάμετρο και το μήκος της στήλης.

β) *Στατική φάση:* Πολική φάση πολυεστερικού τύπου (παραδείγματος χάρη πολυηλεκτρική διαιθυλενογλυκόλη, πολυηλεκτρική βουτανολιόλη, ►C1 πολυαδιπτική ◄ αιθυλενογλυκόλη κ.λπ.), κυανοσιλικόνες ή οποιαδήποτε άλλη φάση επιτρέπει τον απαιτούμενο διαχωρισμό (βλέπει διάταξη 5). Η ►C1 στατική ◄ θα πρέπει να καταλαμβάνει ποσοστό 5 % (m/m) έως 20 % (m/m) του υλικού πληρώσεως. Για ορισμένους διαχωρισμούς μπορεί να χρησιμοποιηθεί μη πολική στατική φάση.

3.1.3.3. Προετοιμασία (κοντισιονάρισμα)

Με τη στήλη αποσυνδεδεμένη, αν είναι δυνατόν, από τον ανιχνευτή, η θερμοκρασία του κλιβάνου φέρεται σταδιακά στους 185 °C και, κατόπιν, διοχετεύεται ρεύμα αδρανούς αερίου μέσω της πρόσφατα παρασκευασμένης στήλης, με ταχύτητα ροής 20 ml/min έως 60 ml/min, για 16 ώρες τουλάχιστον στην παραπάνω θερμοκρασία και για ακόμη 2 ώρες στους 195 °C.

3.1.4. Τριχοειδής στήλη

3.1.4.1. Στήλη κατασκευασμένη από υλικό υδρανές σε σχέση με τις προς ανάλυση ουσίες (συνήθως γυαλί ή συντετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου). Η εσωτερική διάμετρος κυμαίνεται μεταξύ 0,2 mm και 0,8 mm. Η εσωτερική επιφάνεια υποβάλλεται σε κατάλληλη κατεργασία (επιφανειακή προετοιμασία, αδρανοποίηση), πριν επιστρωθεί με την στατική φάση. Στις περισσότερες περιπτώσεις αρκεί μήκος 25 μέτρων.

▼B

- 3.1.4.2. Στατική φάση, συνήθως τύπου πολυγλυκόλης ►C1 (πολυαιθυλενογλυκόλη) 20 000 ◄, πολυεστέρα (πολυηλεκτρική βουτανοδιόλη) ή πολικού πολυσιλοξάνιου (κυανοσιλικόνες). Κατάλληλες είναι οι στήλες με σταυροδεσμούς.

Σημείωση 5: Τα πολικά πολυσιλοξάνια υπάρχει κίνδυνος να προκαλέσουν δυσχέρειες στην ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό του λινολενικού οξέος και των οξέων C₂₀. Οι επιστρώσεις πρέπει να είναι λεπτές, δηλαδή πάχους 0,1 μm έως ►C1 0,2μm ◄.

- 3.1.4.3. Συναρμολόγηση και προετοιμασία (κοντισιονάρισμα) της στήλης. Κατά τη συναρμολόγηση των τριχοειδών στηλών τηρούνται οι συνήθειες προφυλάξεις, δηλαδή διάταξη της στήλης στον κλίβανο (στήριγμα), επιλογή και συναρμολόγηση των συνδέσμων (στεγανότητα), σύνδεση των άκρων της στήλης με το σύστημα έγχυσης και τον ανιχνευτή (μείωση των μη ωφελίμων χώρων). Η στήλη τοποθετείται κάτω από ρεύμα φέροντος αερίου [παραδείγματος χάρι 0,3 bar (30 kPa), προκειμένου για στήλη μήκους ►C1 25 m ◄ και εσωτερικής διαμέτρου 0,3 mm].

Το κοντισιονάρισμα της στήλης γίνεται με προγραμματισμό της θερμοκρασίας του κλιβάνου ώστε να ανέρχεται 3 °C/min από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι μια θερμοκρασία 10 °C χαμηλότερη από το σημείο αντοχής της στατικής φάσης. Η θερμοκρασία του κλιβάνου διατηρείται στην τιμή αυτή για μία ώρα, μέχρι να σταθεροποιηθεί η γραμμή βάσεως, έπειτα επαναφέρεται στους 180 °C για εργασία σε ισόθερμες συνθήκες.

Σημείωση 6: Στο εμπόριο κυκλοφορούν κατάλληλα προετοιμασμένες στήλες.

- 3.1.5. Ανιχνευτής, κατά προτίμηση επιδεχόμενος θέρμανση σε θερμοκρασία υψηλότερη από της στήλης.

3.2. Σύριγγα

Η σύριγγα πρέπει να έχει ανώτατη χωρητικότητα 10 μl και να είναι αριθμημένη ανά 0,1 μl.

3.3. Καταγραφέας

Αν για τον υπολογισμό της σύστασης του προς ανάλυση μείγματος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί καμπύλη καταγραφέα, απαιτείται ηλεκτρονικός καταγραφέας μεγάλης ακρίβειας, συμβατός με τις χρησιμοποιούμενες συσκευές. Ο καταγραφέας πρέπει να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

α) ταχύτητα απόκρισης μικρότερη από 1,5 s, κατά προτίμηση 1 s (ταχύτητα απόκρισης είναι ο χρόνος που χρειάζεται η γραφίδα του καταγραφέα για να καλύψει το διάστημα 8 % έως 90 % μετά την ακαριαία είσοδο σήματος 100 %).

β) πλάτος χαρτιού 20 cm κατ' ελάχιστο όριο.

γ) ταχύτητα χαρτιού ρυθμιζόμενη σε διάφορες τιμές μεταξύ ►C1 0,4 cm/min ◄ και 2,5 cm/min.

3.4. Ολοκληρωτής ή υπολογιστής (προαιρετικά)

Ταχείς και ακριβείς υπολογισμοί μπορούν να επιτευχθούν με τη βοήθεια ηλεκτρονικού ολοκληρωτή ή ηλεκτρονικού υπολογιστή· το όργανο αυτό πρέπει να παρέχει γραμμική απόκριση με επαρκή ευαισθησία, καθώς και ικανοποιητική διόρθωση, όσον αφορά την απόκλιση της γραμμής βάσεως.

▼ B**4. ΕΚΤΕΛΕΣΗ**

Οι εργασίες που περιγράφονται στα σημεία 4.1 έως 4.3 αφορούν τη χρήση ανιχνευτή φλογός ιονισμού. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί, εναλλακτικά, αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (καθαρόμετρο). Στην περίπτωση αυτή, οι συνθήκες της εργασίας τροποποιούνται όπως περιγράφεται στη διάταξη 6.

4.1. Συνθήκες δοκιμής**4.1.1. Εκλογή των άριστων συνθηκών εργασίας****4.1.1.1. Κοινή στήλη**

Για την εκλογή των συνθηκών δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ακόλουθες μεταβλητές:

- α) το μήκος και η διάμετρος της στήλης·
- β) το είδος και η ποσότητα της στατικής φάσης·
- γ) η θερμοκρασία της στήλης·
- δ) η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου·
- ε) η απαιτούμενη διακριτική ικανότητα·
- ς) η ποσότητα του δείγματος δοκιμής, η οποία επιλέγεται με τρόπο ώστε η συνδεσμολογία ανιχνευτή και ηλεκτρομέτρου να παρέχει γραμμική απόκριση·
- η) η διάρκεια της ανάλυσης.

Οι τιμές που παρατίθενται στους πίνακες 1 και 2 γενικά, οδηγούν στα επιθυμητά αποτελέσματα, δηλαδή αποτελεσματικότητα τουλάχιστον 2 000 θεωρητικών πλακών ανά μέτρο μήκους της στήλης, για το στεατικό μεθυλεστέρα και έκλουσή του σε 15 min περίπου.

Εφόσον το επιτρέπει ο χρησιμοποιούμενος εξοπλισμός, η θερμοκρασία του συστήματος έγχυσης θα πρέπει να είναι περίπου 200 °C και του ανιχνευτή ίση ή υψηλότερη από τη θερμοκρασία της στήλης.

Κατά κανόνα, ο λόγος της ταχύτητας ροής του υδρογόνου, που διοχετεύεται στον ανιχνευτή φλογός ιονισμού προς την ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου κυμαίνεται από 1:2 έως 1:1, ανάλογα με τη διάμετρο της στήλης. Η ταχύτητα ροής του οξυγόνου είναι περίπου πενταπλάσια έως δεκαπλάσια από του υδρογόνου.

Πίνακας 1

Εσωτερική διάμετρος στήλης mm	Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου ml/min
2	15 έως 25
3	20 έως 40
4	40 έως 60

Πίνακας 2

► C1 Συγκέντρωση στατικής φάσης ◀ % (m/m)	Θερμοκρασία στήλης °C
5	175
10	180
15	185
20	185

▼ **B**

4.1.1.2. Τριχοειδής στήλη

Τα χαρακτηριστικά αποδοτικότητας και δυνατότητας των τριχοειδών στηλών σημαίνουν ότι ο διαχωρισμός των συστατικών και η διάρκεια της ανάλυσης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου στη στήλη. Κατά συνέπεια, για την επίτευξη άριστων συνθηκών εργασίας, είναι απαραίτητο να ρυθμιστεί αυτή η παράμετρος (ή, πιο απλά, το ύψος απωλειών της στήλης), ανάλογα με το αν επιδιώκεται καλύτερος διαχωρισμός ή ταχύτερη ανάλυση.

4.1.2. Προσδιορισμός του αριθμού θεωρητικών πλακών (αποδοτικότητα) και της διακριτικής ικανότητας (βλέπε σχήμα 1).

Εκτελείται ανάλυση μείγματος στεατικού μεθυλεστέρα και ελαϊκού μεθυλεστέρα σε ίσες περίπου αναλογίες (παραδείγματος χάρι μεθυλεστέρες από βούτυρο κακάου).

Η θερμοκρασία της στήλης και η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου επιλέγονται με τρόπο ώστε το μέγιστο της κορυφής που αντιστοιχεί στο στεατικό μεθυλεστέρα να καταγράφεται 15 min περίπου μετά την κορυφή που αντιστοιχεί στο διαλύτη. Χρησιμοποιείται αρκετή ποσότητα από το μείγμα των μεθυλεστέρων, έστω η κορυφή που αντιστοιχεί στο στεατικό μεθυλεστέρα να καταλαμβάνει περίπου τα 3/4 της πλήρους κλίμακας.

Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, n (αποδοτικότητα), υπολογίζεται με τον τύπο:

$$n = 16 \left(\frac{d_{r(I)}}{\omega_{(I)}} \right)^2$$

ενώ η διακριτική ικανότητα, R με τον τύπο:

$$R = \frac{2 \Delta}{\omega_{(I)} + \omega_{(II)}}$$

όπου:

$d_{r(I)}$ = είναι η απόσταση κατακράτησης, σε χιλιοστόμετρα, από την αρχή του χρωματογραφήματος μέχρι το μέγιστο της κορυφής που αντιστοιχεί στο στεατικό μεθυλεστέρα,

$\omega_{(I)}$ και $\omega_{(II)}$ = είναι τα πλάτη, σε χιλιοστόμετρα, των κορυφών που αντιπροσωπεύουν το στεατικό μεθυλεστέρα και τον ελαϊκό μεθυλεστέρα, αντίστοιχα, τα οποία μετρώνται μεταξύ των σημείων τομής των εφαπτομένων στα σημεία καμπής των καμπυλών και της γραμμής βάσεως,

Δ = είναι η απόσταση, σε χιλιοστόμετρα, μεταξύ των μεγίστων των κορυφών που αντιστοιχούν στο στεατικό μεθυλεστέρα και στον ελαϊκό μεθυλεστέρα,

▼ **M2**

και ο δείκτης διακριτικής ικανότητας με τον τύπο

$$I_r = \frac{a}{b}$$

όπου:

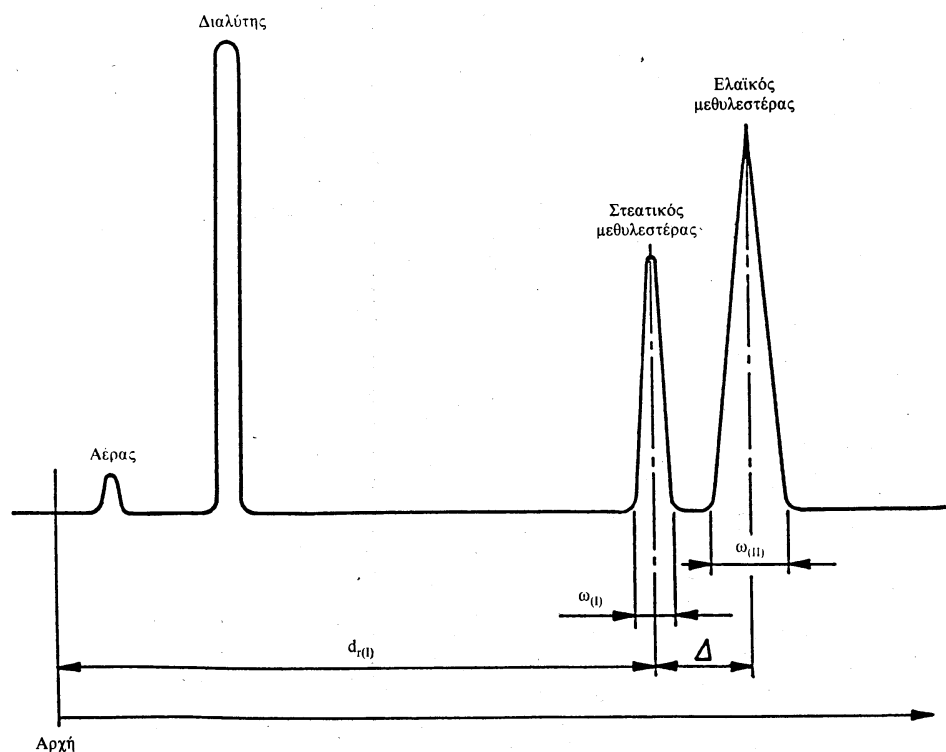
a = είναι το ύψος της χαμηλότερης κορυφής, μετρούμενο ως προς τη γραμμή βάσεως και

b = είναι το ύψος του χαμηλότερου σημείου της κοιλάδας της περιλαμβανόμενης μεταξύ των δύο προσκείμενων κορυφών, μετρούμενο ως προς τη γραμμή βάσεως.



Σχήμα 1

Χρωματογράφημα για τον προσδιορισμό του αριθμού θεωρητικών πλακών (αποδοτικότητα) και της διαχωριστικής ικανότητας



Οι συνθήκες εργασίας που πρέπει να επιλέγονται είναι εκείνες με τις οποίες επιτυγχάνονται αποδοτικότητα τουλάχιστον 2 000 θεωρητικών πλακών ανά μέτρο μήκους της στήλης, για το στεατικό μεθυλεστέρα, και διακριτική ικανότητα τουλάχιστον 1,25.

4.2. Δείγμα δοκιμής

Με τη βοήθεια της σύριγγας (3.2), λαμβάνονται 0,1 μl έως 2 μl από το διάλυμα μεθυλεστέρων που έχει παρασκευαστεί σύμφωνα με το παράρτημα XB και ►C1 εγχύονται ◄ στη στήλη.

Σε περίπτωση που οι εστέρες δεν είναι διαλυμένοι, παρασκευάζεται διάλυμα συγκεντρώσεως περίπου 100 mg/ml σε επτάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας, από το οποίο ►C1 εγχύονται ◄ 0,1 μl έως 1 μl.

Αν πρόκειται για ανάλυση συστατικών που περιέχονται μόνο σε ίχνη, η ποσότητα του δείγματος δοκιμής μπορεί να αυξηθεί (έως 10 φορές).

4.3. Ανάλυση

Οι συνθήκες εργασίας είναι γενικά εκείνες που καθορίζονται στο σημείο 4.1.1.

Η εργασία, ωστόσο, μπορεί να εκτελεστεί σε χαμηλότερη θερμοκρασία στήλης, όταν απαιτείται ο προσδιορισμός λιπαρών οξέων με λιγότερα από 12 άτομα άνθρακα, ή σε υψηλότερη, προκειμένου για τον προσδιορισμό λιπαρών οξέων με περισσότερα από 20 άτομα άνθρακα. Όταν το επιτρέπουν οι περιστάσεις, είναι δυνατόν να εφαρμοστεί προγραμματισμός θερμοκρασίας και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις. Παράδειγμα: αν το δείγμα περιέχει τους μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων με λιγότερα από 12 άτομα άνθρακα, το δείγμα εγχέεται στους 100 °C (ή στους 50-60 °C παρουσία βουτυρικού οξέος) και αμέσως η θερμοκρασία φέρεται στην ►C1 μέγιστη τιμή ◄ με ταχύτητα 4 °C/min έως 8 °C/min. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να γίνει συνδυασμός των δύο τεχνικών.

▼B

Μετά τη θέρμανση με προγραμματισμό θερμοκρασίας, συνεχίζεται η έκλουση σε σταθερή θερμοκρασία, μέχρι να εκλουσθούν όλα τα συστατικά. Εάν το όργανο δεν επιτρέπει θέρμανση με προγραμματισμό θερμοκρασίας, η εργασία εκτελείται σε δύο καθορισμένες θερμοκρασίες μεταξύ 180 °C και 195 °C.

Συνιστάται, εφόσον είναι απαραίτητο, η διεξαγωγή δύο αναλύσεων με στατικές φάσεις διαφορετικής πολικότητας, ώστε να επιβεβαιωθεί η απουσία συγκαλυμμένων κορυφών, παραδείγματος χάρη στην περίπτωση της ταυτόχρονης παρουσίας συζυγών C_{18:3} και ►C1 C₂₀: 0 ◄ ή C_{18:3} και C_{18:2}.

4.4. Καταγραφή του χρωματογραφήματος και των γραφικών παραστάσεων αναφοράς

Εκτελείται ανάλυση του πρότυπου μείγματος αναφοράς (2.3), με τις ίδιες συνθήκες εργασίας όπως για το δείγμα, και μετρώνται οι χρόνοι ή οι αποστάσεις κατακράτησης για τα λιπαρά οξέα που αποτελούν. Για κάθε βαθμό ακορέστου, σχεδιάζονται σε ημίλογαριθμικό χαρτί οι γραφικές παραστάσεις που απεικονίζουν το λογάριθμο του χρόνου ή της απόστασης κατακράτησης συναρτήσει του αριθμού ατόμων άνθρακα. Σε ισόθερμες συνθήκες, οι καμπύλες για οξέα με ευθεία άλυσσο και τον ίδιο βαθμό ακορέστου θα πρέπει να είναι ευθείες γραμμές, σχεδόν παράλληλες.

Είναι απαραίτητο να αποφεύγονται οι συνθήκες εκείνες, που επιτρέπουν «συγκαλυμμένες κορυφές», δηλαδή με τις οποίες η διακριτική ικανότητα είναι ανεπαρκής για το διαχωρισμό δύο συστατικών.

5. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

5.1. Ποιοτική ανάλυση

Οι κορυφές που αντιστοιχούν στους μεθυλεστέρες του δείγματος ταυτοποιούνται από τις καμπύλες του σημείου 4.4, αν είναι απαραίτητο με παρεμβολή.

5.2. Ποσοτική ανάλυση

5.2.1. Προσδιορισμός της σύστασης

Εκτός από εξαιρετικές περιπτώσεις, εφαρμόζεται η μέθοδος εσωτερικής κανονικοποίησης, δηλαδή λαμβάνεται ως δεδομένο ότι στο χρωματογράφημα εμφανίζεται το σύνολο των συστατικών του δείγματος, με τρόπο ώστε το συνολικό εμβαδόν που περικλείεται από τις κορυφές να αντιπροσωπεύει το 100 % των συστατικών (πλήρης έκλουση).

Εάν ο χρησιμοποιούμενος εξοπλισμός περιλαμβάνει ολοκληρωτή, χρησιμοποιούνται οι αριθμοί που λαμβάνονται από αυτόν. Σε αντίθετη περίπτωση, το εμβαδόν που περικλείεται από κάθε κορυφή προσδιορίζεται πολλαπλασιάζοντας το ύψος της επί το πλάτος της στο μέσον του ύψους, ενώ λαμβάνονται υπόψη, κατά περίπτωση, οι διάφορες εξασθενήσεις του σήματος κατά την καταγραφή.

5.2.2. Τρόπος υπολογισμού

5.2.2.1. Γενική περίπτωση

Η περιεκτικότητα σε δεδομένο συστατικό i, εκφραζόμενη σε κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία μεθυλεστέρων, υπολογίζεται με τον προσδιορισμό του επί τοις εκατό ποσοστού που αντιπροσωπεύει το εμβαδόν της αντίστοιχης κορυφής ως προς το άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών, εφαρμόζοντας τον τύπο:

▼C1

$$\frac{AI}{\sum A} \times 100$$

▼B

όπου:

AI = είναι το εμβαδόν που περικλείεται από την κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο συστατικό i,

►C1 $\sum A$ ◄ = είναι το άθροισμα των εμβαδών που περικλείονται από όλες τις κορυφές.

▼B

Το αποτέλεσμα δίδεται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

Σημείωση 7: Στη γενική αυτή περίπτωση, θεωρείται ότι το αποτέλεσμα του υπολογισμού βάσει των σχετικών εμβαδών αντιπροσωπεύει εκατοστιαία αναλογία κατά μάζα. Για τις περιπτώσεις όπου η υπόθεση αυτή δεν ευσταθεί, βλέπε σημείο 5.2.2.2.

5.2.2.2. Χρήση συντελεστών διορθώσεως

Σε ορισμένες περιπτώσεις, παραδείγματος χάρι παρουσία λιπαρών οξέων με λιγότερα από 8 άτομα άνθρακα ή οξέων με δευτερεύουσες ομάδες, όταν χρησιμοποιούνται ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας ή όταν απαιτείται οπωσδήποτε η μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συντελεστές διορθώσεως για τη μετατροπή του επί τοις εκατό ποσοστού των εμβαδών των κορυφών σε κατά μάζα εκατοστιαίες αναλογίες συστατικών.

Οι συντελεστές διορθώσεως καθορίζονται με τη βοήθεια χρωματογραφήματος που προκύπτει από την ανάλυση μείγματος μεθυλεστέρων γνωστής σύστασης η οποία εκτελείται με πανομοιότυπες συνθήκες εργασίας όπως η ανάλυση του δείγματος.

Για το εν λόγω μείγμα αναφοράς, η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία του συστατικού *i* παρέχεται από τον τύπο:

$$\frac{m_i}{\sum m} \times 100$$

όπου

m_i = είναι η μάζα του συστατικού *i* στο μείγμα αναφοράς,

$\sum m$ = είναι η συνολική μάζα των διαφόρων συστατικών του μείγματος αναφοράς.

Από το χρωματογράφημα του μείγματος αναφοράς (4.4), υπολογίζεται το επί τοις εκατό ποσοστό (εμβαδόν/εμβαδόν) για το συστατικό *i* ως εξής:

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

όπου

A_i = είναι το εμβαδόν που περικλείεται από την κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο συστατικό *i*,

$\sum A$ = είναι το άθροισμα των εμβαδών που περικλείονται από όλες τις κορυφές.

Ο συντελεστής διορθώσεων υπολογίζεται τότε ως λόγος

$$K_i = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

Στην κοινή πρακτική, οι συντελεστές διορθώσεως εκφράζονται σε σχέση με το συντελεστή K_{C16} οπότε προκύπτουν οι σχετικοί συντελεστές

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

Όσον αφορά το δείγμα, η περιεκτικότητα σε κάθε συστατικό *i* εκφραζόμενη ως κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία μεθυλεστέρων, είναι

$$\frac{K'_i \times A_i}{\sum (K'_i \times A_i)} \times 100$$

Τα αποτελέσματα δίδονται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

▼ B

5.2.2.3. Χρήση εσωτερικού προτύπου

Σε ορισμένες αναλύσεις (παραδείγματος χάρι όταν ο ποσοτικός προσδιορισμός δεν αφορά όλα τα λιπαρά οξέα, όπως στην περίπτωση ταυτόχρονης παρουσίας οξέων με 4 και 6 άτομα άνθρακα και οξέων με 16 και 18 άτομα άνθρακα, ή όταν είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί η απόλυτη ποσότητα ενός λιπαρού οξέος σε ένα δείγμα) απαιτείται η χρήση εσωτερικού προτύπου. Χρησιμοποιούνται συνήθως λιπαρά οξέα με 5, 15 ή 17 άτομα άνθρακα. Ο συντελεστής διορθώσεως (αν έχει εφαρμογή) θα πρέπει να προσδιορίζεται και για το εσωτερικό πρότυπο.

Η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία του συστατικού i , εκφραζόμενη σε μεθυλεστέρες, παρέχεται από τον τύπο:

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

όπου

A_i = είναι το εμβαδόν που περικλείεται από την κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο συστατικό i ,

A_s = είναι το εμβαδόν που περικλείεται από την κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο,

K'_i = είναι ο συντελεστής διορθώσεως για το συστατικό i (σχετικός, ως προς τον K_{C16}),

K'_s = είναι ο συντελεστής διορθώσεως για το εσωτερικό πρότυπο (σχετικός, ως προς τον K_{C16}),

m = είναι η μάζα του δείγματος δοκιμής, σε χιλιοστόγραμμα,

m_s = είναι η μάζα του εσωτερικού προτύπου, σε χιλιοστόγραμμα.

Τα αποτελέσματα δίδονται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

▼ M2

6. ΕΙΔΙΚΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ TRANS ΙΣΟΜΕΡΩΝ

Είναι δυνατό να προσδιορισθεί η περιεκτικότητα σε trans ισομερή των λιπαρών οξέων με αριθμό ατόμων άνθρακος μεταξύ 10 και 24, με διαχωρισμό των μεθυλεστέρων και με χρήση τροχοειδών στηλών χρωματογραφίας οι οποίες έχουν συγκεκριμένη πολικότητα.

- 6.1. Τριχοειδής στήλη από οξείδιο του πυριτίου, εσωτερικής διαμέτρου από 0,25 έως 0,32 mm και μήκους 50 m, με επίχρισμα κυανοπροπυλσιλικόνης πάχους μεταξύ 0,1 και 0,3 μm (τύπου SP 2340, τύπου SP 2380, C.P.sil 88, Silor 10 και άλλων παρομοίων).

▼ M21

- 6.2. Οι μεθυλεστέρες παρασκευάζονται σύμφωνα με τη μέθοδο B του παραρτήματος X«B». Οι λιπαρές ουσίες των οποίων η περιεκτικότητα σε ελεύθερα οξέα υπερβαίνει το 3 % πρέπει να εξουδετερώνονται προηγουμένως σύμφωνα με το σημείο 5.1.1 του παραρτήματος VII.

▼ M2

- 6.3. Οι συνθήκες εργασίας για τη χρωματογραφία αέρος φάσεως είναι συνολικά οι ακόλουθες:

— η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίζεται στους 150 °C έως 230 °C (π.χ. 165 °C επί 15 λεπτά και εν συνεχεία αυξάνεται κατά 5 °C ανά λεπτό μέχρι τη θερμοκρασία των 200 °C),

— θερμοκρασία της διάταξης εγχύσεως: 250 °C όταν χρησιμοποιείται το σύστημα split ή η αρχική θερμοκρασία της στήλης όταν χρησιμοποιείται το σύστημα εγχύσεως πάνω στη στήλη (on column),

▼ M2

— θερμοκρασία του ανιχνευτή: 260 °C,

— παροχή του φέροντος αερίου (ήλιο και υδρογόνο): 1,2 ml ανά λεπτό.

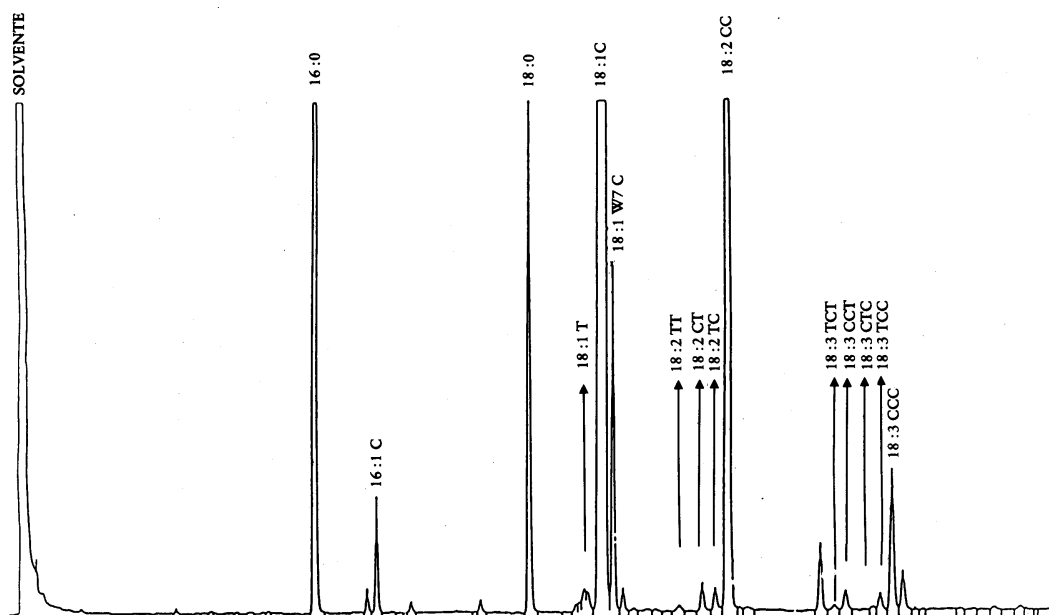
Η εισαγόμενη ποσότητα πρέπει να είναι τέτοια ώστε στις χρησιμοποιούμενες συνθήκες ευαισθησίας το ύψος της κορυφής που αντιστοιχεί στο μεθυλεστέρα του αραχιδικού οξέος να είναι ίσο ή να υπερβαίνει το 20 % του κάτω μέρος της κλίμακας.

- 6.4. Η αναγνώριση των διαφόρων μεθυλεστέρων γίνεται επί τη βάση των χρόνων συγκρατήσεως οι οποίοι συγκρίνονται προς εκείνους των μειγμάτων αναφοράς. (Όπως αναφέρεται στο σημείο 2.3).

Οι εστέρες των λιπαρών οξέων trans εκλύονται πριν από τα αντίστοιχα ισομερή cis. Το σχήμα 2 εμφανίζει σχετικό χρωματογράφημα.

Σχήμα 2

Χρωματογράφημα για τον προσδιορισμό των ισομερών trans των λιπαρών οξέων με τριχοειδή στήλη



- 6.5. Η αποδοτικότητα της στήλης, η προσδιοριζόμενη σύμφωνα με το σημείο 4.1.2, πρέπει να επιτρέπει διαχωρισμό ορισμένων κρίσιμων ζευγών, για παράδειγμα το ζεύγος που σχηματίζεται από τη ζώνη των trans ισομερών του ισοελαϊκού οξέος και την κορυφή του ελαϊκού οξέος, trans C 18:1/cis C 18:1, με δείκτη διακριτικής ικανότητας ανώτερο του 2,

- 6.6. Το ποσοστό των διαφόρων οξέων trans υπολογίζεται με τη βοήθεια της σχέσεως ανάμεσα στο εμβαδόν της αντίστοιχης κορυφής και το άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών.

Λαμβάνονται υπόψη τα ποσοστά των οξέων:

- trans δεκαοκτανικών (T 18:1) που αναφέρονται στο παράρτημα του παρόντος κανονισμού ως σύνολο των trans ισομερών ελαϊκού οξέος,
- cis-trans και trans-cis δεκαοκταδιενικών [(CT/TC) 8:2] που αναφέρονται στο παράρτημα του παρόντος κανονισμού ως σύνολο των trans ισομερών λινελαϊκού οξέος,
- trans-cis-trans, cis-cis-trans, cis-trans-cis, trans-cis-cis, δεκαοκτατριενικών [(TCT + CCT + CTC + TCC) 18:3], που αναφέρονται στο παράρτημα του παρόντος κανονισμού ως σύνολο των trans ισομερών λινολενικού οξέος.

▼ **M2**

Σημείωση 8: Λαμβανομένων υπόψη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών αυτής της μεθόδου, τα αποτελέσματα να δίδονται με δύο δεκαδικούς.

▼ **B**

7. ΕΙΔΙΚΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ — ΧΡΗΣΗ ΚΑΘΑΡΟΜΕΤΡΟΥ ΩΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ (ΠΟΥ ΛΕΙΤΟΥΡΓΕΙ ΒΑΣΕΙ ΤΗΣ ΑΡΧΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑΣ)

Για τον προσδιορισμό της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης μείγματος μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή που λειτουργεί βάσει της αρχής των μεταβολών της θερμικής αγωγιμότητας (καθαρόμετρο). Στην περίπτωση αυτή, οι συνθήκες που καθορίζονται στις διατάξεις 3 και 4 θα πρέπει να τροποποιούνται όπως φαίνεται στον πίνακα 3.

Για την ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιούνται οι συντελεστές διορθώσεως που ορίζονται στο σημείο 5.2.2.2.

Πίνακας 3

Μεταβλητή	Τιμή/συνθήκη
Στήλη	Μήκος: 2 έως 4 μέτρα Εσωτερική διάμετρος: 4 mm
Υπόστρωμα	Μέγεθος κόκκων από 160 μm έως 200 μm
Συγκέντρωση ακίνητης φάσης	15 % (m/m) έως 25 % (m/m)
Φέρον αέριο	Ήλιο ή, ελλείψει αυτού, υδρογόνο, με τη χαμηλότερη δυνατή περιεκτικότητα σε οξυγόνο
Βοηθητικά	Κανένα
Θερμοκρασία συστήματος έγχυσης	40—60 °C υψηλότερη από της στήλης
Θερμοκρασία στήλης	Μεταξύ 180 °C και 200 °C
Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου	Συνήθως μεταξύ 60 ml/min και 80 ml/min
Με ποσότητα του εγχέομένου δείγματος δοκιμής	Συνήθως μεταξύ 0,5 μl και 2 μl

8. ► **C1** ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ◀

► **C1** Στην έκθεση ανάλυσης περιγράφονται ◀ οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για παρασκευή των μεθυλεστέρων και για την αεριοχρωματογραφική ανάλυσή τους, καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Αναφέρονται επίσης όλες οι λεπτομέρειες των εργασιών, που δεν καθορίζονται στο παρόν διεθνές πρότυπο ή θεωρούνται προαιρετικές, καθώς και των τυχόν συμβάντων, που ενδέεται να έχουν επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την πλήρη ταυτοποίηση του δείγματος.

▼ **M19***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Χ «Β»***ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ
ΚΑΙ ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΟΥ**

Για την παρασκευή των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων ελαιολάδου και πυρηνελαιών συνιστώνται οι ακόλουθες δύο μέθοδοι:

Μέθοδος Α: Μετεστεροποίηση εν ψυχρώ μέσω μεθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου

Μέθοδος Β: Μεθυλίωση εν θερμώ μέσω μεθανολικού διαλύματος μεθυλικού νατρίου ακολουθούμενη από εστεροποίηση σε όξινο περιβάλλον.

Η επιλογή της μίας ή της άλλης μεθόδου εξαρτάται από την προς προσδιορισμό αναλυτική παράμετρο και από την κατηγορία του ελαίου, όπως υποδεικνύεται παρακάτω:

α) προσδιορισμός της διαφοράς μεταξύ πραγματικής και θεωρητικής περιεκτικότητας σε τριγλυκερίδια με την ECN42 (ΔECN42):

— η μέθοδος Α εφαρμόζεται σε δείγματα ελαίων όλων των κατηγοριών ύστερα από καθαρισμό του ελαίου μέσω διέλευσής του από στήλη διοξειδίου του πυριτίου:

β) προσδιορισμός της συστάσεως σε λιπαρά οξέα:

— η μέθοδος Α εφαρμόζεται απευθείας σε δείγματα ελαίων των κατωτέρω κατηγοριών:

— παρθένο ελαιόλαδο με ελεύθερη οξύτητα κάτω του 3,3 %,

— εξευγενισμένο παρθένο ελαιόλαδο,

— ελαιόλαδο (μείγμα παρθένου ελαιολάδου και εξευγενισμένου παρθένου ελαιολάδου),

— εξευγενισμένο πυρηνέλαιο,

— πυρηνέλαιο (μείγμα παρθένου ελαιολάδου και εξευγενισμένου πυρηνελαίου),

— η μέθοδος Β εφαρμόζεται απευθείας σε δείγματα ελαίων των κατωτέρω κατηγοριών:

— παρθένο ελαιόλαδο με ελεύθερη οξύτητα άνω του 3,3 %,

— ακατέργαστο πυρηνέλαιο,

γ) προσδιορισμός των trans ισομερών λιπαρών οξέων:

— η μέθοδος Α εφαρμόζεται απευθείας σε δείγματα ελαίων των κατωτέρω κατηγοριών:

— παρθένο ελαιόλαδο με ελεύθερη οξύτητα κάτω του 3,3 %,

— εξευγενισμένο παρθένο ελαιόλαδο,

— ελαιόλαδο (μείγμα παρθένου ελαιολάδου και εξευγενισμένου παρθένου ελαιολάδου),

— εξευγενισμένο πυρηνέλαιο,

— πυρηνέλαιο (μείγμα παρθένου ελαιολάδου και εξευγενισμένου πυρηνελαίου),

— η μέθοδος Β εφαρμόζεται απευθείας σε δείγματα ελαίων των κατωτέρω κατηγοριών ύστερα από καθαρισμό του ελαίου μέσω διέλευσής του από στήλη διοξειδίου του πυριτίου:

— παρθένο ελαιόλαδο με ελεύθερη οξύτητα άνω του 3,3 %,

— ακατέργαστο πυρηνέλαιο.

▼ **M19****ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥ**

Εφόσον είναι αναγκαίο, τα δείγματα καθαρίζονται διοχετεύοντας το έλαιο από στήλη διοξειδίου του πυριτίου, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης εξάνιο/-διαιθυλαιθέρα (87:13, v/v), όπως περιγράφεται στη μέθοδο IUPAC 2.507.

Ως εναλλακτική μέθοδος, είναι δυνατή η προσφυγή σε εκχύλιση σε στερεά φάση χρησιμοποιώντας φύσιγγες διοξειδίου του πυριτίου. Φύσιγγα διοξειδίου του πυριτίου (1 g, 6 ml) τοποθετείται σε συσκευή εκλούσεως υπό κενό και πλένεται με 6 ml εξανίου. Η εφαρμογή κενού διακόπτεται για να αποφευχθεί ξήρανση της στήλης. Στη συνέχεια, εισάγεται στη στήλη διάλυμα ελαίου (περίπου 0,12 g) σε 0,5 ml εξανίου και εφαρμόζεται κενό για εισαγωγή του διαλύματος στο διοξείδιο του πυριτίου και στη συνέχεια γίνεται έκλουση με 10 ml εξανίου/διαιθυλαιθέρα (87:13 v/v) υπό κενό. Το σύνολο των εκλουσμάτων ομοιογενοποιείται και χωρίζεται σε δύο ίσα μέρη. Το ένα εκ των δύο μερών εξατμίζεται μέχρι ξηράνσεως σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό ελαττωμένη πίεση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 1 ml επτανίου. Το λαμβανόμενο διάλυμα είναι έτοιμο για την ανάλυση των λιπαρών οξέων με CPG. Το δεύτερο μέρος εξατμίζεται και το υπόλειμμα διαλύεται σε 1 ml ακετόνης για ανάλυση των τριγλυκεριδίων, με HPCL εφόσον χρειάζεται.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

1. ***Μέθοδος Α: Μετεστεροποίηση εν ψυχρώ με μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου***

1.1. **Εφαρμογή**

Η ταχεία αυτή μέθοδος εφαρμόζεται σε ελαιόλαδα και πυρηνέλαια με περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα κάτω του 3,3 %. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα δεν εστεροποιούνται με υδροξείδιο του καλίου. Οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων μετεστεροποιούνται βραδύτερα από τους γλυκεριδικούς εστέρες, ενώ είναι δυνατόν να μετεστεροποιηθούν μόνον μερικώς.

1.2. **Αρχή**

Οι μεθυλεστέρες σχηματίζονται με μετεστεροποίηση σε μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου ως ενδιάμεση φάση πριν από τη σαπωνοποίηση (σημείο 5 της μεθόδου ISO 5509:2000, σημείο 5 της μεθόδου IUPAC 2.301).

1.3. **Αντιδραστήρια**

Μεθανόλη με περιεκτικότητα σε νερό όχι άνω του 0,5 % (m/m).

Επτάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας.

Υδροξείδιο του καλίου, μεθανολικό διάλυμα περίπου 2 N: διαλύουμε 11,2 g υδροξειδίου του καλίου σε 100 ml μεθανόλης.

1.4. **Εξοπλισμός**

Δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πώμα (χωρητικότητα 5 ml) εφοδιασμένο με παρέμβυσμα από PTFE.

Βαθμονομημένα ή αυτόματα σιφόνια των 2 και 0,2 ml.

1.5. **Τρόπος εργασίας**

Σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα των 5 ml, ζυγίζονται περίπου 0,1 g δείγματος ελαίου. Προστίθενται 2 ml επτανίου και αναδεύονται. Προστίθενται 0,2 ml μεθανολικού διαλύματος 2 N υδροξειδίου του καλίου, ο σωλήνας πωματίζεται με το εφοδιασμένο με παρέμβυσμα από PTFE πώμα και το όλον αναδεύεται ισχυρά επί 30 δευτερόλεπτα. Ο σωλήνας αφήνεται σε ηρεμία μέχρις ότου το πάνω μέρος του διαλύματος να καταστεί διανέφ. Η άνω στιβάδα, η οποία και περιέχει τους μεθυλεστέρες, μεταγγίζεται. Το διάλυμα επτανίου είναι έτοιμο για έγχυση στο χρωματογράφο. Συνιστάται το διάλυμα να διατηρείται σε ψυγείο μέχρι τη στιγμή της χρωματογραφικής ανάλυσης και να αποφεύγεται η αποθήκευσή του επί χρονικό διάστημα άνω των δώδεκα ωρών.

▼ **M19****2. Μέθοδος Β: Μεθυλίωση εν θερμώ με μεθανολικό διάλυμα μεθυλικού νατρίου ακολουθούμενη από εστεροποίηση σε όξινο περιβάλλον****2.1. Εφαρμογή**

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε ελαιόλαδα και πυρηνέλαια με περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα άνω του 3,3 %.

2.2. Αρχή

Εξουδετέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και επίδραση αλκαλικού μεθανολικού διαλύματος στα γλυκερίδια, ακολουθούμενη από εστεροποίηση των λιπαρών οξέων σε όξινο περιβάλλον (σημείο 4.2 της μεθόδου IUPAC 2.301).

2.3. Αντιδραστήρια

- επτάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας,
- μεθανόλη με περιεκτικότητα σε νερό όχι άνω του 0,5 % (m/m),
- μεθυλικό νάτριο, μεθανολικό διάλυμα 0,2 N: 5 g νατρίου διαλύονται σε 1 000 ml μεθανόλης (μπορεί να παρασκευαστεί από διαλύματα του εμπορίου),
- φαινολοφθαλείνη, 0,2 % μεθανολικό διάλυμα,
- θειικό οξύ, σε μεθανολικό διάλυμα 1 N: 3 ml θειικού οξέος 96 % προστίθενται σε 100 ml μεθανόλης,
- κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου σε νερό.

2.4. Εξοπλισμός

- ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 50 ml, με επίπεδο πυθμένα και μακρύ και στενό εσφυρισμένο λαιμό,
- κάθετος ψυκτήρας: αεροψυκτήρας (μήκους 1 m) με εσφυρισμένη άρθρωση,
- ρυθμιστής βρασμού,
- γυάλινο χωνί.

2.5. Τρόπος εργασίας

0,25 g δείγματος ελαίου προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη με εσφυρισμένο λαιμό των 50 ml. Με τη βοήθεια του χωνιού, προστίθενται 10 ml του μεθανολικού διαλύματος 0,2 N μεθυλικού νατρίου και ο ρυθμιστής βρασμού. Το διάλυμα, έπειτα από δέκα λεπτά, πρέπει να γίνει διαυγές. Η αντίδραση τερματίζεται πρακτικά μετά δεκαπέντε λεπτά. Η φιάλη αποσύρεται από την πηγή θερμότητας, αναμένεται να σταματήσει η αναρροή, ο ψυκτήρας αποσύρεται και προστίθενται δύο σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλείνης. Στο μεθανολικό διάλυμα προστίθενται μερικά ml θειικού οξέος 1 N μέχρις ότου να καταστεί άχρουν και κατόπιν προστίθεται επιπλέον 1 ml ακόμη. Προσαρμόζεται ο ψυκτήρας και το διάλυμα φέρεται εκ νέου σε βρασμό επί είκοσι λεπτά περίπου. Η φιάλη αποσύρεται από την πηγή θερμότητας και επαναψύχεται σε ρεύμα ύδατος. Ο ψυκτήρας απομακρύνεται, προστίθενται 20 ml του κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου νατρίου και το διάλυμα αναδεύεται. Προστίθενται 5 ml επτανίου, η φιάλη πωματίζεται και ανακινείται ζωηρά επί δεκαπέντε δευτερόλεπτα.

Αφήνεται να κατακαθίσει μέχρι πλήρους διαχωρισμού των δύο φάσεων. Προστίθεται εκ νέου μέρος του κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου νατρίου μέχρις ότου η υδατική φάση φθάσει το κάτω μέρος του λαιμού της φιάλης. Τους μεθυλεστέρες περιέχει η πάνω στιβάδα που βρίσκεται στο λαιμό της φιάλης. Το λαμβανόμενο διάλυμα είναι έτοιμο για έγχυση στον αεριοχρωματογράφο.

Προσοχή: Η μεθυλίωση με τη μέθοδο Β πρέπει να γίνεται σε απαγωγό.

▼ **M19****2.6. Εναλλακτικοί αντί της μεθυλίωσης τρόποι σύμφωνα με τη μέθοδο B****2.6.1. Μέθοδος Γ****2.6.1.1. Αρχή**

Η προς ανάλυση λιπαρή ύλη υποβάλλεται σε κατεργασία με μεθανολικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος σε κλειστό φιαλίδιο, στους 100 °C.

2.6.1.2. Εξοπλισμός

— Γυάλινο παχύτοιχο φιαλίδιο χωρητικότητας περίπου 5 ml (ύψος 40 έως 45 mm, διάμετρος 14 έως 16 mm).

— Βαθμονομημένα σιφόνια του 1 και 2 ml.

2.6.1.3. Αντιδραστήρια

Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος σε 2 % μεθανόλη, παρασκευαζόμενο από αέριο υδροχλώριο και άνυδρη μεθανόλη (σημείωση 1).

Εξάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας.

Σημείωση 1: Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διαλύματα υδροχλωρίου σε μεθανόλη του εμπορίου. Στο εργαστήριο, είναι εύκολο να παρασκευαστούν μικρές ποσότητες αερίου υδροχλωρίου τροποποιώντας το διάλυμα του εμπορίου ($P = 1,18$), με προσθήκη μερικών σταγονών πυκνού θειικού οξέος. Επειδή η μεθανόλη απορροφά ισχυρώς το αέριο υδροχλώριο, σκόπιμο είναι να λαμβάνονται όλες οι δυνατές προφυλάξεις χρήσεως κατά τη διάλυση (π.χ. εισαγωγή του αερίου με τη βοήθεια μικρού ανεστραμμένου χωνιού που μόλις εγγίζει την επιφάνεια της μεθανόλης). Είναι δυνατόν να παρασκευαστούν εκ των προτέρων σημαντικές ποσότητες μεθανολικών διαλυμάτων υδροχλωρικού οξέος που διατηρούνται απόλυτα στο σκοτάδι μέσα σε φιάλες εφοδιασμένες με γυάλινο πώμα. Το αντιδραστήριο αυτό μπορεί επίσης να παρασκευαστεί διαλύοντας ακετυλοχλωρίδιο σε άνυδρη μεθανόλη.

2.6.1.4. Τρόπος λειτουργίας

— Στο γυάλινο φιαλίδιο προστίθενται 0,2 g λιπαρής ύλης που έχει προηγουμένως ξηρανθεί με θειικό νάτριο και διηθηθεί, και κατόπιν προστίθενται 2 ml του μεθανολικού διαλύματος υδροχλωρικού οξέος. Το φιαλίδιο κλείνεται.

— Το φιαλίδιο βυθίζεται σε λουτρό στους 100 °C επί 40 λεπτά.

— Το φιαλίδιο ψύχεται σε ρεύμα ύδατος, το ανοίγουμε και προστίθενται 2 ml απεσταγμένου νερού και 1 ml εξανίου.

— Φυγοκεντρούμε και η εξανική φάση απομακρύνεται, έτοιμη προς χρήση.

2.6.2. Μέθοδος Δ**2.6.2.1. Αρχή**

Η προς ανάλυση λιπαρή ύλη θερμαίνεται υπό αναρροή με μεθανόλη, εξάνιο και θειικό οξύ. Οι λαμβανόμενοι ούτως μεθυλεστέρες εκχυλίζονται με πετρελαϊκό αιθέρα.

2.6.2.2. Εξοπλισμός

— Δοκιμαστικός σωλήνας χωρητικότητας περίπου 20 ml με κάθετο αεροφυκτήρα μήκους περίπου 1 m, εφοδιασμένο με εσφυρισμένη άρθρωση.

▼ M19

- Βαθμονομημένο σιφόνιο 5 ml.
- Διαχωριστική χοάνη 50 ml.
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 10 και 25 ml.
- Δοκιμαστικός σωλήνας με κωνικό πυθμένα των 15 ml.

2.6.2.3. Αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο μεθυλίωσης: άνυδρη μεθανόλη, εξάνιο και πυκνό θειικό οξύ ($p = 1,84$ στην ακόλουθη αναλογία: 75:25:1 (V/V/V)).
- Πετρελαϊκός αιθέρας 40 έως 60 °C.
- Άνυδρο θειικό νάτριο.

2.6.2.4. Τρόπος εργασίας

Στο σωλήνα των 20 ml εισάγονται 0,1 g ελαίου και προστίθενται 5 ml από το αντιδραστήριο μεθυλίωσης.

Συνδέεται ο ψυκτήρας και θερμαίνουμε σε υδρόλουτρο μέχρι βρασμού επί 30 λεπτά (σημείωση 2).

Το μείγμα μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη 50 ml με 10 ml απεσταγμένου ύδατος και 10 ml πετρελαϊκού αιθέρα. Ανακινούμε ισχυρά και αναμένουμε μέχρις ότου να επέλθει διαχωρισμός φάσεων. Η υδατική φάση απομακρύνεται και η αιθερική στιβάδα πλένεται δύο φορές με 20 ml απεσταγμένου ύδατος. Στη διαχωριστική χοάνη προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου, αναδεύουμε, αφήνουμε σε ηρεμία επί μερικά λεπτά και διηθούμε, συλλέγοντας το διήθημα σε σωλήνα κωνικού πυθμένα 15 ml.

Ο διαλύτης εξατμίζεται σε υδρόλουτρο σε ρεύμα αζώτου.

Σημείωση 2: Για τον έλεγχο του βρασμού, στο σωλήνα εισάγεται μικρή γυάλινη ράβδος και η θερμοκρασία του υδρόλουτρο περιορίζεται στους 90 °C.

3. Παράμετροι ακριβείας

Η στατιστική αξιολόγηση της ακρίβειας των μεθόδων Α και Β δημοσιεύτηκε από το διεθνές συμβούλιο ελαιολάδου στον κανονισμό του COI/T.20/CO. αριθ. 24.

ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΕΡΙΑΣ ΦΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΟΥ

1. Τρόπος εργασίας

Η ανάλυση με χρωματογραφία αέριας φάσης διαλυμάτων λιπαρών εστέρων σε εξάνιο πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρότυπο ISO 5508, μέσω τριχοειδούς στήλης (50 m μήκος × 0,25 ή 0,32 mm εσωτερική διάμετρος) καλυμμένης με κυανοπροπυλοσιλικόνη, όπως υποδεικνύεται για τον προσδιορισμό των trans ισομερών λιπαρών οξέων (COI/T.20/Doc. αριθ. 17).

Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται το τυπικό χρωματογραφικό προφίλ πυρηνελαίου περιέχοντος μεθυλικούς και αιθυλικούς εστέρες λιπαρών οξέων και trans ισομερή μεθυλικών εστέρων.

2. Υπολογισμοί**2.1. Για να υπολογιστεί η σύσταση σε λιπαρά οξέα και το ΔECN42, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα λιπαρά οξέα:**

Μυριστικό (C14:0).

Παλμιτικό (C16:0). Άθροισμα των εμβαδών των κορυφών που αντιστοιχούν στους μεθυλικούς και αιθυλικούς εστέρες.

▼ **M19**

Παλμιτελαϊκό (C16:1). Άθροισμα των εμβαδών των κορυφών που αντιστοιχούν στα ισομερή ω9 και ω7 του μεθυλικού εστέρα.

Δεκαεπτανοϊκό (C17:0).

Δεκαεπτενοϊκό (C17:1).

Στεατικό (C18:0).

Ελαϊκό (C18:1). Άθροισμα των εμβαδών των κορυφών που αντιστοιχούν στα ισομερή ω9 και ω7 του μεθυλικού εστέρα, του αιθυλικού εστέρα και των trans ισομερών του μεθυλικού εστέρα.

Λινελαϊκό (C18:2). Άθροισμα των εμβαδών των κορυφών που αντιστοιχούν στους μεθυλικούς και αιθυλικούς εστέρες και στα trans ισομερή του μεθυλικού εστέρα.

Αραχιδικό (C20:0).

Λινολενικό (C18:3). Άθροισμα των εμβαδών του μεθυλικού εστέρα και των trans ισομερών του μεθυλικού εστέρα.

Εικοσενοϊκό (C20:1).

Βεχενικό (C22:0).

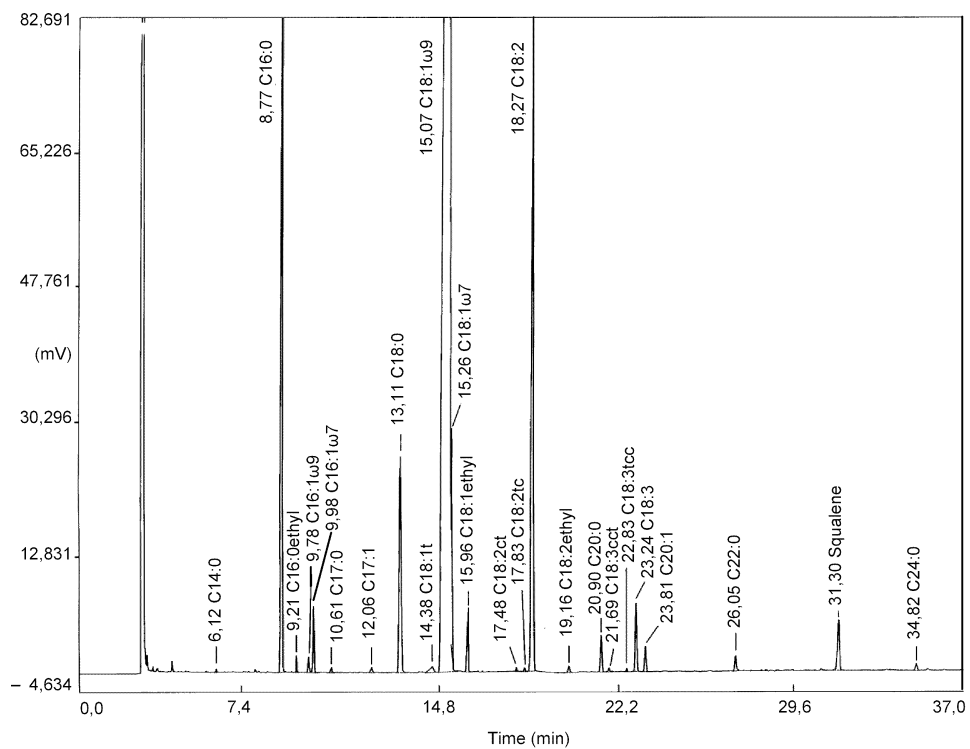
Λιγνοκηρικό (C24:0).

Το σκουαλένιο δεν λαμβάνεται υπόψη στον υπολογισμό του συνολικού εμβαδού.

- 2.2. Για τον υπολογισμό του ποσοστού του trans-C18:1, χρησιμοποιείται η κορυφή που αντιστοιχεί στους μεθυλικούς εστέρες του λιπαρού αυτού οξέος. Για το άθροισμα [trans-C18:2 + trans-C18:3], προστίθενται όλες οι κορυφές που αντιστοιχούν στα trans ισομερή των δύο αυτών λιπαρών οξέων. Για να υπολογιστεί το συνολικό εμβαδόν, λαμβάνονται υπόψη όλες οι αναφερόμενες στο 2.1 κορυφές (βλέπε COI/T.20/Doc. αριθ. 17).

Ο υπολογισμός του ποσοστού κάθε λιπαρού οξέος πραγματοποιείται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\% X = (\text{Εμβαδόν } X \times 100) / (\text{συνολικό εμβαδόν})$$

▼ **M19**

Εικόνα 1: Χρωματογραφικό προφίλ πυρηγενλαίου, ληφθέν με τη μέθοδο της μεθυλίωσης εν ψυχρώ. Οι χρωματογραφικές κορυφές αντιστοιχούν στους μεθυλεστέρες, εκτός αν υποδεικνύεται διαφορετικά



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XI

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ►C1 ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ◄ ΤΟΥ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΕ ΑΛΟΓΟΝΟΥΧΟΥΣ ΠΤΗΤΙΚΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ**

1. ΑΡΧΗ

Αεριοχρωματογραφική ανάλυση σύμφωνα με την τεχνική «head space».

2. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

2.1. Συσκευή αερίου χρωματογραφίας, με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

2.2. Συσκευή «head space».

2.3. Στήλη αερίου χρωματογραφίας από γυαλί μήκους 2 μέτρων και διαμέτρου 2 mm, ►C1 με στατική φάση ◄. OV101 ως 10 % ή ισοδύναμο, που εμποτίζει γη διατόμων, η οποία έχει αποτεφρωθεί, εκπλυθεί με οξέα και μετατραπεί σε σιλάνιο, κοκκομετρικού βαθμού 80 ως 100 Mesh.

2.4. Φέρον αέριο και βοηθητικό αέριο: άζωτο για αέριο χρωματογραφία, ►C1 κατάλληλο για ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων ◄.

2.5. Γυάλινα φιαλίδια 10 ως 15 ml, με επένδυση από τεφλόν και ένα πώμα από αλουμίνιο εφοδιασμένο με στόμιο, για δειγματοληψία με σύριγγα.

2.6. Λαβίδες ερμητικού κλεισίματος.

2.7. Σύριγγα για αέριο 0,5 ως 2 ml.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

3.1. Πρότυπα: αλογονούχοι πτητικοί διαλύτες ►C1 χρωματογραφικής καθαρότητας ◄.

4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

4.1. Ζυγίζουμε ακριβώς 3 g ελαιολάδου περίπου σε ένα γυάλινο φιαλίδιο (μιας χρήσεως), κλείνουμε το φιαλίδιο ερμητικά. Εισάγουμε το φιαλίδιο σε θερμοστάτη σε 70 °C για μία ώρα. Λαμβάνουμε με ακρίβεια, με τη βοήθεια σύριγγας, όγκο 0,2 ως 0,5 ml από το «head space». Το εγχέουμε στη στήλη της συσκευής αερίου χρωματογραφίας που ρυθμίζεται ως εξής:

— θερμοκρασία έγχυσης: 150 °C,

— θερμοκρασία στήλης: 70 ως 80 °C,

— θερμοκρασία ανίχνευσης: 200 ως 250 °C.

Είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν άλλες θερμοκρασίες στο βαθμό που τα αποτελέσματα είναι ισοδύναμα.

4.2. Διαλύματα αναφοράς. Προετοιμάζουμε πρότυπα διαλύματα, χρησιμοποιώντας εξευγενισμένο ελαιόλαδο χωρίς ίχνη διαλυτών, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0,05 και 1 mg/kg και ανάλογες με την υπολογιζόμενη περιεκτικότητα του δείγματος. Η ενδεχόμενη διάλυση πρέπει να γίνεται με πεντάνιο.

4.3. ►C1 Ποσοτικός προσδιορισμός ◄. Συγκρίνουμε τα εμβαδά ή τα ύψη των κορυφών του φάσματος που αντιστοιχούν στο δείγμα και στο πρότυπο διάλυμα με την υπολογιζόμενη πλησιέστερη συγκέντρωση. Αν η σχετική απόκλιση είναι μεγαλύτερη από 10 %, η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί, συγκρίνοντας με ένα νέο πρότυπο διάλυμα, μέχρι η σχετική συγκέντρωση να ανταποκρίνεται στη σχετική απόκλιση που προαναφέρεται. Η περιεκτικότητα υπολογίζεται με βάση ένα μέσο όρο των στοιχειωδών εγχύσεων.

4.4. Διατύπωση αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα ►C1 εκφράζονται ◄ σε mg/kg (ppm). Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 0,01 mg/kg.

▼ M22

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΧΙΙ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΔΙΕΘΝΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ**1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Η παρούσα μέθοδος στηρίζεται στην απόφαση του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου υπ' αριθ. DEC-21/95-V/2007, της 16ης Νοεμβρίου 2007, περί αναθεωρημένης μεθόδου οργανοληπτικής αξιολόγησης του παρθένου ελαιολάδου. Αποβλέπει στον καθορισμό της διαδικασίας αξιολόγησης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παρθένων ελαιολάδων κατά την έννοια του σημείου I του παραρτήματος XVI του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1234/2007 και στη θέσπιση μεθόδου ταξινόμησής τους βάσει των εν λόγω χαρακτηριστικών. Η μέθοδος περιλαμβάνει επίσης ενδείξεις για προαιρετική επισήμανση.

Η περιγραφόμενη μέθοδος ισχύει μόνο για τα παρθένα ελαιόλαδα και στην ταξινόμησή τους ή στην επισήμανσή τους με βάση την ένταση των αντιληπτών ελαττωμάτων, του φρουτώδους και άλλων θετικών ιδιοτήτων που καθορίζονται από ομάδα επιλεγμένων, εκπαιδευμένων και δοκιμασμένων δοκιμαστών που συγκροτούνται σε ομάδα.

2. ΓΕΝΙΚΑ

Όσον αφορά το γενικό βασικό λεξιλόγιο, την αίθουσα δοκιμών καθώς και το ποτήρι δοκιμής των ελαιολάδων καθώς και για κάθε άλλο ζήτημα που συνδέεται με την παρούσα μέθοδο, συνιστάται η τήρηση των προδιαγραφών που προβλέπονται από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, ιδίως στην απόφαση υπ' αριθ. DEC-21/95-V/2007, της 16ης Νοεμβρίου 2007, περί αναθεωρημένης μεθόδου οργανοληπτικής αξιολόγησης του παρθένου ελαιολάδου.

3. ΕΙΔΙΚΟ ΛΕΞΙΛΟΓΙΟ**3.1. Θετικές ιδιότητες**

Φρουτώδης: σύνολο οσφραντικών αισθήσεων, οι οποίες εξαρτώνται από την ποικιλία των ελαιών και είναι χαρακτηριστικές του ελαιολάδου που προέρχεται από υγιείς και φρέσκιες ελιές, άγουρες ή ώριμες, το οποίο γίνεται αισθητό απευθείας από τη μύτη ή από την οπισθορινική οδό.

Το *φρουτώδες* χαρακτηρίζεται ως *άγουρο* όταν οι οσφραντικές αισθήσεις θυμίζουν ανώριμους καρπούς και χαρακτηρίζουν ελαιόλαδο που προέρχεται από πράσινες ελιές.

Το *φρουτώδες* χαρακτηρίζεται ως *ώριμο* όταν οι οσφραντικές αισθήσεις θυμίζουν ώριμους καρπούς και χαρακτηρίζουν ελαιόλαδο που προέρχεται από πράσινες και ώριμες ελιές.

Πικρό: χαρακτηριστική στοιχειώδης γεύση ελαιολάδου που έχει ληφθεί από πράσινες ελιές ή από ελιές των οποίων το χρώμα αρχίζει να αλλάζει, και η οποία γίνεται αντιληπτή από τις περιχαρακωμένες γευστικές θηλές που σχηματίζουν το γευστικό λάμδα της γλώσσας.

Πικάντικο: κιναισθητική αίσθηση καύσου, χαρακτηριστική ελαιολάδων που παράγονται στην αρχή της ελαιοκομικής περιόδου, κυρίως από ελιές που είναι ακόμη πράσινες, η οποία μπορεί να γίνει αντιληπτή σε όλη τη στοματική κοιλότητα ιδίως στο λαϊμό.

3.2. Αρνητικές ιδιότητες

Ατροχάδο/Μούργα: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές συγκεντρωμένες σε σωρούς ή αποθηκευμένες υπό συνθήκες τέτοιες ώστε να βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο αναερόβιας ζύμωσης ή ελαιολάδου που έχει παραμείνει σε επαφή με το ίζημα το οποίο καθιζάνει σε βαρέλια και δεξαμενές φύλαξης και έχει επίσης υποστεί αναερόβια ζύμωση.

Μουχλιασμένο-νοτισμένο: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχονται από ελιές προσβεβλημένες από μύκητες και ζυμομύκητες λόγω αποθήκευσης των καρπών επί πολλές ημέρες σε περιβάλλον με υγρασία.

▼ M22

Κρασώδες-ξυδάτο/Οξίνο-ξινό: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ορισμένων ελαιολάδων που θυμίζουν κρασί ή ξύδι. Οφείλεται, βασικά, σε διαδικασία αερόβιας ζύμωσης στις ελιές ή στα κατάλοιπα ελαιόπαστας σε σάκους που δεν πλύθηκαν σωστά και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό οξικού οξέος, οξικού αιθυλεστέρα και αιθανόλης.

Μεταλλικό: χαρακτηριστική οσμή-γεύση που θυμίζει μέταλλο. Είναι χαρακτηριστική ελαιολάδου που έχει παραμείνει επί μακρόν σε επαφή με μεταλλικές επιφάνειες, κατά τη διάρκεια της θραύσης του ελαιοκάβρου, της μάλαξης, της πίεσης ή της αποθήκευσης.

Ταγρό: χαρακτηριστική οσμή-γεύση των ελαιολάδων που έχουν υποστεί διαδικασία έντονης οξείδωσης.

Ψημένο ή καμένο: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδων προερχόμενη από υπερβολική ή/και παρατεταμένη θέρμανση κατά την παραγωγή και, ιδιαίτερα, κατά τη θερμομάλαξη της ελαιόπαστας, όταν αυτή πραγματοποιηθεί σε ακατάλληλες θερμικές συνθήκες.

Άχυρο-ξύλο: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ορισμένων ελαιολάδων που προέρχονται από ελιές που έχουν αφυδατωθεί.

Χονδροειδές: πηχτή και ζυμώδης αίσθηση που παράγεται στο στόμα από ορισμένα παλαιά έλαια.

Λιπαντικά: οσμή-γεύση ελαιολάδου που θυμίζει πετρέλαιο, γράσο ή ορυκτέλαιο.

Απόνερα: οσμή-γεύση που αποκτάται από το ελαιόλαδο ύστερα από παρατεταμένη επαφή του με τα απόνερα του ελαιοτριβείου τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση.

Άλμη: οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές διατηρημένες σε αλατούχο διάλυμα.

Σπάρτο: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές οι οποίες έχουν υποστεί έκθλιψη σε καινούργιους σάκους από σπάρτο. Μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το αν πρόκειται για σάκους κατασκευασμένους από χλωρό ή από αποξηραμένο σπάρτο.

Χωματίλα: οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές οι οποίες έχουν συλλεχθεί μαζί με χώμα ή λάσπες και δεν έχουν πλυθεί.

Σκουλήκι: οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές οι οποίες έχουν προσβληθεί σοβαρά από νύμφες δάκου της ελαίας (*Bactrocera oleae*).

Αγγούρι: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου λόγω υπερβολικά μακρόχρονης συσκευασίας σε ερμητικά κλειστά δοχεία και ειδικά σε λευκοσιδηρά δοχεία, και η οποία αποδίδεται στο σχηματισμό 2,6-εννεανοδιενάλης.

Υγρό ξύλο: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδων που παράγονται από ελιές οι οποίες υπέστησαν παγετό επί του δένδρου.

3.3. Προαιρετική ορολογία για την επισήμανση

Κατόπιν αιτήματος, ο επικεφαλής της ομάδας των δοκιμαστών μπορεί να πιστοποιήσει ότι τα αξιολογηθέντα ελαιόλαδα ικανοποιούν τους ορισμούς και τα περιθώρια που αντιστοιχούν στις ακόλουθες εκφράσεις και επίθετα ανάλογα με την ένταση και την αντίληψη των ιδιοτήτων:

- α) για κάθε θετική ιδιότητα που αναφέρεται στο σημείο 3.1 (*φρουτώδες*, *ενδεχομένως με το χαρακτηρισμό άγουρο ή ώριμο, πικάντικο ή πικρό*):
 - i) ο όρος «έντονο» μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν η διάμεση τιμή της σχετικής ιδιότητας υπερβαίνει το 6,
 - ii) ο όρος «μέσο» μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν η διάμεση τιμή της σχετικής ιδιότητας βρίσκεται μεταξύ 3 και 6,
 - iii) ο όρος «ελαφρό» μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν η διάμεση τιμή της σχετικής ιδιότητας είναι μικρότερη του 3,

▼ M22

- iv) οι σχετικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς αναφορά στα επίθετα που απαριθμούνται στα σημεία i), ii) και iii) όταν η διάμεση τιμή της σχετικής ιδιότητας είναι ίση ή μεγαλύτερη του 3·
- β) ο όρος «σταθερό» μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ελαιόλαδο που δεν έχει περιπέσει σε αστάθεια. Ως αστάθεια νοείται η γευστικο-οσφραντική και κιναισθητική αίσθηση του ελαιολάδου στην οποία η διάμεση τιμή της ιδιότητας *πικρό* ή/και της ιδιότητας *πικάντικο* υπερβαίνει κατά δύο μονάδες τη διάμεση τιμή της ιδιότητας *φρουτώδες*·
- γ) η έκφραση «γλυκό ελαιόλαδο» μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ελαιόλαδο στο οποίο η διάμεση τιμή της ιδιότητας *πικρό* και εκείνη της ιδιότητας *πικάντικο* είναι μικρότερες ή ίσες με 2.

4. ΟΜΑΔΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η ομάδα αποτελείται από τον επικεφαλής της ομάδας και από οκτώ έως δώδεκα δοκιμαστές.

Ο επικεφαλής της ομάδας πρέπει να είναι εξαιρετικά καταρτισμένος, γνώστης και με ιδιαίτερη εμπειρία στους διάφορους τύπους ελαιολάδων. Είναι υπεύθυνος για την ομάδα, την οργάνωση και τη λειτουργία της, την προετοιμασία, την κωδικοποίηση και την παρουσίαση των δειγμάτων στους δοκιμαστές, καθώς και για τη συλλογή των δεδομένων και τη στατιστική τους επεξεργασία.

Ο επικεφαλής της ομάδας επιλέγει τους δοκιμαστές και επιβλέπει την εκπαίδευσή τους και τον έλεγχο των επιδόσεών τους, ώστε οι ικανότητές τους να διατηρούνται πάντοτε σε επαρκές επίπεδο.

Οι δοκιμαστές που διενεργούν τους οργανοληπτικούς ελέγχους του ελαιολάδου πρέπει να επιλέγονται και να εκπαιδεύονται ανάλογα με την ικανότητά τους να διακρίνουν μεταξύ παρόμοιων δειγμάτων, σύμφωνα με τον οδηγό του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου περί επιλογής, εκπαίδευσης και ελέγχου των αναγνωρισμένων δοκιμαστών παρθένων ελαιολάδων.

Οι ομάδες οργανοληπτικής εξέτασης πρέπει να αναλάβουν τη δέσμευση να συμμετέχουν στις οργανοληπτικές αξιολογήσεις που προβλέπονται σε εθνικό, κοινοτικό ή διεθνές επίπεδο για τον περιοδικό έλεγχο και την εναρμόνιση των κριτηρίων αντίληψης. Εξάλλου, οι ομάδες δοκιμαστών που έχουν συγκροτηθεί σύμφωνα με τα προβλεπόμενα στο άρθρο 4 παράγραφος 1 του παρόντος κανονισμού, πρέπει να παρέχουν ετησίως στο οικείο κράτος μέλος κάθε πληροφορία σχετικά με τη σύνθεση και τον αριθμό των αξιολογήσεων που πραγματοποίησαν ως αναγνωρισμένη ομάδα.

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

5.1. Χρησιμοποίηση του φύλλου χαρακτηρισμού από το δοκιμαστή

Το φύλλο χαρακτηρισμού που χρησιμοποιείται από το δοκιμαστή εμφανίζεται στο προσάρτημα Α της παρούσας μεθόδου.

Κάθε δοκιμαστής μέλος της ομάδας πρέπει να οσφρανθεί και στη συνέχεια να γευτεί το ελαιόλαδο που υποβάλλεται σε εξέταση. Στη συνέχεια, πρέπει να καταγράψει στις κλίμακες των 10 cm που υπάρχουν στο φύλλο χαρακτηρισμού που έχει στη διάθεσή του την ένταση με την οποία αντιλαμβάνεται καθεμία από τις αρνητικές και θετικές ιδιότητες ⁽¹⁾. Σε περίπτωση που αντιληφθεί τον άγουρο ή ώριμο χαρακτήρα της ιδιότητας του φρουτώδους, ο δοκιμαστής συμπληρώνει το αντίστοιχο τετραγωνίδιο στο φύλλο χαρακτηρισμού.

Στην περίπτωση κατά την οποία γίνουν αντιληπτές αρνητικές ιδιότητες που δεν αναφέρονται στο φύλλο χαρακτηρισμού, αυτές πρέπει να καταγραφούν στο χώρο με το χαρακτηρισμό «άλλες», χρησιμοποιώντας τον ή τους όρους που τις περιγράφουν με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια μεταξύ εκείνων που ορίζονται στην παρούσα μέθοδο.

⁽¹⁾ Ο δοκιμαστής, όταν παρατηρήσει μέσω της άμεσης όσφρησης κάποια εξαιρετικά έντονη αρνητική ιδιότητα, μπορεί να απόσχει της πρόγευσης. Θα σημειώσει στο φύλλο χαρακτηρισμού την εξαιρετική αυτή κατάσταση.

▼ M22

5.2. Χρήση των δεδομένων από τον επικεφαλής της ομάδας

Ο επικεφαλής της ομάδας πρέπει να μαζεύει τα φύλλα χαρακτηρισμού που έχουν συμπληρωθεί από τους δοκιμαστές και να ελέγχει τις αποδοθείσες εντάσεις των ιδιοτήτων. Σε περίπτωση εντοπισμού κάποιας ανωμαλίας, ζητά από το δοκιμαστή να αναθεωρήσει το φύλλο χαρακτηρισμού και, αν κρίνει αναγκαίο, να επαναλάβει τη δοκιμή.

Ο επικεφαλής της ομάδας μπορεί να εισαγάγει τα δεδομένα κάθε δοκιμαστή σε πρόγραμμα πληροφορικής σύμφωνο με τη μέθοδο του στατιστικού υπολογισμού της διάμεσης τιμής που εμφανίζεται στο προσάρτημα Β. Η εισαγωγή των δεδομένων για ένα δείγμα πρέπει να γίνεται με τη βοήθεια πίνακα αποτελούμενου από εννέα στήλες, οι οποίες αντιστοιχούν στις εννέα αισθητηριακές ιδιότητες και από n γραμμές, οι οποίες αντιστοιχούν στους n δοκιμαστές της ομάδας.

Όταν για κάποια αρνητική ιδιότητα, την οποία έχει αντιληφθεί τουλάχιστον σε 50 % της ομάδας, έχει συμπληρωθεί η στήλη «άλλες», υπολογίζεται η διάμεση τιμή για το εν λόγω ελάττωμα και το ελαιόλαδο κατατάσσεται αναλόγως.

Ο επικεφαλής της ομάδας δεν μπορεί να πιστοποιήσει ότι το αξιολογούμενο ελαιόλαδο πληροί τους όρους που αναφέρονται στο σημείο 3.3 α) όσον αφορά τους όρους «άγουρο» και «ώριμο» παρά μόνο όταν τουλάχιστον το 50 % της ομάδας έχει επισημάνει ότι αντελήφθη τον άγουρο ή ώριμο χαρακτήρα της ιδιότητας του φρουτώδους.

Στην περίπτωση αναλύσεων που πραγματοποιούνται στο πλαίσιο των ελέγχων συμμόρφωσης, πραγματοποιείται μία δοκιμή. Σε περίπτωση αναλύσεων επανελέγχου ο επικεφαλής της ομάδας πραγματοποιεί διπλή ανάλυση. Σε περίπτωση αναλύσεων αναβαθμολόγησης, η αξιολόγηση πρέπει να πραγματοποιηθεί εις τριπλούν. Στις περιπτώσεις αυτές, η διάμεση τιμή των ιδιοτήτων υπολογίζεται βάσει του μέσου όρου της διάμεσης τιμής. Όλες οι εν λόγω πολλαπλές αναλύσεις πρέπει να γίνουν στο πλαίσιο ξεχωριστών συναντήσεων.

5.3. Κατάταξη των ελαίων

Το έλαιο κατατάσσεται στις ακόλουθες κατηγορίες, ανάλογα με τη διάμεση τιμή των ελαττωμάτων και τη διάμεση τιμή της ιδιότητας του φρουτώδους. Η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων ορίζεται ως η διάμεση τιμή του ελαττώματος που γίνεται αντιληπτό με τη μεγαλύτερη ένταση. Η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων και η διάμεση τιμή του φρουτώδους εκφράζονται με ένα μόνο δεκαδικό ψηφίο και η τιμή του ανθεκτικού συντελεστή διακύμανσης που τις καθορίζει πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 20 %.

Η κατάταξη του ελαιολάδου πραγματοποιείται σε σχέση με την τιμή της διάμεσης τιμής των ελαττωμάτων και της διάμεσης τιμής του φρουτώδους με τα διαστήματα αναφοράς που καθορίζονται κατωτέρω. Τα όρια των εν λόγω διαστημάτων έχουν οριστεί λαμβανομένου υπόψη του σφάλματος της μεθόδου και θεωρούνται απόλυτα. Το λογισμικό επιτρέπει την οπτική απεικόνιση της κατάταξης σε πίνακα στατιστικών δεδομένων ή σε γράφημα.

- α) *Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο*: η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι ίση με 0 και η διάμεση τιμή για το φρουτώδες είναι μεγαλύτερη του 0.
- β) *Παρθένο ελαιόλαδο*: η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι μεγαλύτερη του 0 και μικρότερη ή ίση με 3,5 και η διάμεση τιμή για το φρουτώδες είναι μεγαλύτερη του 0.
- γ) *Λαμπάντε ελαιόλαδο*: η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι μεγαλύτερη του 3,5· ή η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι μικρότερη ή ίση με 3,5 και η διάμεση τιμή για το φρουτώδες είναι ίση με 0.

5.4. Ιδιότητες περιπτώσεις

Όταν η διάμεση τιμή θετικής ιδιότητας εκτός του φρουτώδους είναι μεγαλύτερη του 5,0, ο επικεφαλής της ομάδας το σημειώνει στο πιστοποιητικό ανάλυσης του ελαιολάδου.

▼ **M22***Προσάρτημα Α***Φύλλο χαρακτηρισμού παρθένου ελαιολάδου**

ΕΝΤΑΣΗ ΑΝΤΙΑΨΗΣ ΤΩΝ ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΩΝ

Ατροχάδο/Μούργα	_____ →
Μουχλιασμένο — νοτισμένο-χωματίλα	_____ →
Κρασιώδες-ξυδάτο — Όξινο-ξινό	_____ →
Μεταλλικό	_____ →
Ταγγό	_____ →
Άλλες (προσδιορίστε)	_____ →

ΕΝΤΑΣΗ ΑΝΤΙΑΨΗΣ ΤΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ

Φρουτώδες	_____ →
Άγουρο <input type="checkbox"/> Όριμο <input type="checkbox"/>	
Πικρό	_____ →
Πικάντικο	_____ →

Όνομα του δοκιμαστή:**Κωδικός δείγματος:****Ημερομηνία:****Παρατηρήσεις:**

▼ **M22***Προσάρτημα Β***ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΔΙΑΜΕΣΗΣ ΤΙΜΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΡΙΩΝ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ****Διάμεση τιμή**

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

Διάμεση τιμή είναι ο πραγματικός αριθμός X_m που χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι η πιθανότητα (P) να είναι οι τιμές της κατανομής (X) μικρότερες από τον αριθμό αυτό (X_m), είναι μικρότερη ή ίση με 0,5 και ότι, ταυτόχρονα, η πιθανότητα (P) να είναι οι τιμές της κατανομής (X) μικρότερες ή ίσες με X_m , είναι μεγαλύτερη ή ίση με 0,5. Ένας άλλος ορισμός ορίζει τη διάμεση τιμή ως το 50ό εκατοστημόριο διαμερισμού μιας κατανομής αριθμών διατεταγμένων κατ' αυξούσα τάξη. Με άλλα λόγια, η διάμεση τιμή αντιπροσωπεύει την κεντρική τιμή μιας διατεταγμένης σειράς περιττού πλήθους ή το μέσο όρο των δύο κεντρικών τιμών μιας διατεταγμένης σειράς άρτιου πλήθους.

Ανθεκτική τυπική απόκλιση

Για να υπάρχει μια αξιόπιστη εκτίμηση της διακύμανσης που παράγεται γύρω από τη διάμεση τιμή, πρέπει να αναφερθούμε στην εκτίμηση της ανθεκτικής τυπικής απόκλισης κατά Stuart και Kendall. Ο ακόλουθος τύπος εκφράζει την ασυμπτωτική τυπική απόκλιση, δηλαδή τη σταθερή εκτίμηση της διακύμανσης των εξεταζόμενων δεδομένων, όπου N είναι ο αριθμός των παρατηρήσεων και IQR το διατεταρτημοριακό διάστημα, το οποίο περικλείει ακριβώς το 50 % των περιπτώσεων μιας οποιασδήποτε κατανομής πιθανότητας.

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

Ο υπολογισμός του διατεταρτημοριακού διαστήματος πραγματοποιείται υπολογίζοντας το μέγεθος της απόκλισης μεταξύ του 75ου και του 25ου εκατοστημορίου.

$$IQR = 75o - 25o \text{ εκατοστημόριο}$$

Εκατοστημόριο είναι η τιμή X_{pc} που χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι η πιθανότητα (P) να είναι οι τιμές της κατανομής μικρότερες της X_{pc} είναι μικρότερη ή ίση με ένα καθορισμένο εκατοστό και ότι, ταυτόχρονα, η πιθανότητα (P) να είναι οι τιμές της κατανομής μικρότερες ή ίσες με τη X_{pc} είναι μεγαλύτερη ή ίση με το εν λόγω εκατοστό. Εκατοστό είναι το κλάσμα της λαμβανόμενης κατανομής. Στην περίπτωση της διάμεσης τιμής, αυτή είναι ίση με το 50/100.

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

Στην πράξη, εκατοστημόριο είναι η τιμή κατανομής που αντιστοιχεί σε καθορισμένο εμβαδόν χαρασσόμενο από την καμπύλη κατανομής ή πυκνότητας. Για παράδειγμα, το 25ο εκατοστημόριο αντιπροσωπεύει την τιμή κατανομής που αντιστοιχεί σε εμβαδόν ίσο με 0,25 ή 25/100.

Ανθεκτικός συντελεστής διακύμανσης %

Ο $CVr\%$ είναι καθαρός αριθμός, δηλαδή χωρίς διαστάσεις, που δείχνει το ποσοστό διακύμανσης της αναλυόμενης σειράς αριθμών. Για το λόγο αυτό, ο συντελεστής αυτός είναι πολύ χρήσιμος για την επαλήθευση της αξιοπιστίας των μελών της ομάδας.

$$CVr \% = \frac{S^*}{Me} 100$$

▼ M22**Όρια εμπιστοσύνης 95 % στη διάμεση τιμή**

Τα όρια εμπιστοσύνης (IC) με πιθανότητα 95 % (τιμή σφάλματος πρώτου είδους ίση με 0,05 ή 5 %) αντιπροσωπεύουν τα όρια όπου η διάμεση τιμή θα μπορούσε να κυμαίνεται αν υποθεθεί ότι είναι δυνατή η επανάληψη του πειράματος άπειρες φορές. Στην πράξη, το εύρος αυτό δείχνει την περιοχή διακύμανσης της δοκιμής υπό τις κρατούσες λειτουργικές συνθήκες, με την υπόθεση ότι η δοκιμή θα μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές. Το εύρος βοηθά στην εκτίμηση, όπως και στην περίπτωση του CVt%, της αξιοπιστίας της δοκιμής.

$$IC_{\text{ανωτ}} = Me + (c.S^*)$$

$$IC_{\text{κατωτ}} = Me - (c.S^*)$$

όπου c, στην περίπτωση των ορίων εμπιστοσύνης 0,95, είναι 1,96.

▼ M20

▼ M19

▼ B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XV

1. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΕΛΑΙΟ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΠΥΡΗΝΩΝ

1.1. Εξοπλισμός

- κατάλληλη συσκευή εκχύλισης εφοδιασμένη με σφαιρική φιάλη των 200 έως 250 ml,
- λουτρό ηλεκτρικής θερμάνσεως (αμμόλουτρο, υδρόλουτρο κ.λπ.) θερμαινόμενη πλάκα,
- αναλυτικός ζυγός,
- φούρνος ρυθμισμένος στους 80 °C το μέγιστο,
- φούρνος ηλεκτρικής θερμάνσεως εφοδιασμένος με θερμοστατικό μηχανήμα, ρυθμιζόμενος στους 103 ± 2 °C με μηχανισμό εμφύσησής αέρος ή μείωσης της πίεσης,
- μηχανικός μύλος εύκολα καθαριζόμενος, που να επιτρέπει τη σύνθλιψη, χωρίς να επιφέρει ανύψωση της θερμοκρασίας ή αισθητή μεταβολή της περιεκτικότητας σε υγρασία και έλαιο,
- ► **C1** φύσιγγα εκχύλισης και υδρόφιλος βάμβαξ ◄ ή διηθητικός χάρτης, απαλλαγμένα συστατικών εκχυλιζόμενων με το εξάνιο,
- ξηραντήρας,
- κόσκινο διαμέτρου οπών 1 mm,
- μικρά τεμαχίδια ξηρανθείσης ελαφρόπετρας.

1.2. Αντιδραστήρια

Κανονικό εξάνιο (technical grade), το οποίο μετά από πλήρη εξάτμιση να αφήνει υπόλειμμα το πολύ 0,002 g ανά 100 ml.

2. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

2.1. Παρασκευή του δείγματος δοκιμής

Αλέθουμε το εργαστηριακό δείγμα εάν παρίσταται ανάγκη, με μηχανικό μύλο, καλά καθαρισμένο, ώστε να λάβουμε τεμάχια που να δύνανται να διέλθουν από το κόσκινο.

Χρησιμοποιούμε το εικοστό περίπου του δείγματος για τον πλήρη καθαρισμό του μύλου, απορρίπτουμε το άλεσμα αυτό, αλέθουμε την υπόλοιπη ποσότητα, τη συλλέγουμε, την αναμειγνύουμε προσεκτικά και την αναλύουμε αμέσως.

2.2. Ποσότης δοκιμής

Μόλις ολοκληρωθεί η εργασία λειοτριβήσεως, ζυγίζουμε 10 g του δείγματος δοκιμής με ακρίβεια 0,01 g.

2.3. Προετοιμασία των εκχυλιστικών δακτυλίων (cartouche)

Τοποθετούμε το δείγμα δοκιμής εντός του δακτύλιου και πωματίζουμε με ► **C1** υδρόφιλο βάμβακα ◄. Αν χρησιμοποιείται διηθητικός χάρτης, το άλεσμα τυλίγεται μέσα σ' αυτόν.

2.4. Προκαταρκτική ξήρανση

Αν ο ελαιοπυρήνας είναι πολύ υγρός (παραδείγματος χάρη περιεκτικότητα σε υγρασία και πτητικές ύλες άνω του 10 %), ξηραίνουμε αυτόν προκαταρκτικώς διά τοποθέτησής του ετοιμού δακτύλιου (ή του διηθητικού χάρτου) επί τι χρονικό διάστημα μέσα σε φούρνο θερμανθέντα σε θερμοκρασία όχι ανώτερη των 80 °C για να ελαττώσουμε την περιεκτικότητα σε υγρασία και πτητικές ύλες κάτω του 10 %.

▼ B

2.5. Προετοιμασία της σφαιρικής φιάλης

Ζυγίζουμε, με ακρίβεια 1 mg, φιάλη περιέχουσα ένα ή δύο τεμαχίδια ελαφρόπετρας, προηγουμένως ξηρανθείσα μέσα σε φούρνο στους 103 ± 2 °C και εν συνεχεία ψυχθείσα μέσα σε ξηραντήρα για διάστημα τουλάχιστον μίας ώρας.

2.6. Πρώτη εκχύλιση

Μέσα στη συσκευή εκχυλίσσεως εισάγουμε ►C1 τη φύσιγγα ◄ (ή το διηθητικό χάρτη) που περιέχει την ποσότητα δοκιμής. Χύνουμε εντός της σφαιρικής φιάλης την απαραίτητη ποσότητα εξανίου. Συνδέουμε τη φιάλη με τη συσκευή εκχυλίσσεως και το σύνολο τοποθετείται στο ηλεκτρικά θερμαινόμενο λουτρό. Ρυθμίζουμε τη θέρμανση κατά τέτοιο τρόπο ώστε η ταχύτης επαναρροής να είναι τουλάχιστον 3 σταγόνες το δευτερόλεπτο (βρασμός μέτριος, όχι ισχυρός).

Μετά τέσσερις ώρες εκχυλίσσεως ψύχουμε. Απομακρύνουμε ►C1 τη φύσιγγα ◄ από τη συσκευή εκχυλίσσεως και το θέτουμε σε ρεύμα αέρος για να απομακρύνουμε τον εμποτισθέντα διαλύτη.

2.7. Δεύτερη εκχύλιση

Αδειάζουμε ►C1 τη φύσιγγα ◄ εντός μικρο-αλεστήρος και αλέθουμε σε όσο το δυνατό λεπτότερα τεμάχια. Επαναφέρουμε το μείγμα πάλι μέσα ►C1 στη φύσιγγα ◄ ποσοτικά και τοποθετούμε το δακτύλιο μέσα στη συσκευή εκχυλίσσεως.

Συνεχίζουμε την εκχύλιση για δύο επιπλέον ώρες, χρησιμοποιώντας την ίδια σφαιρική φιάλη που περιέχει το πρώτο εκχύλισμα.

Το λαμβανόμενο στη φιάλη εκχυλίσσεως διάλυμα πρέπει να είναι διαυγές. Αν δεν είναι, το διηθούμε με διηθητικό χάρτη και ξεπλένουμε την αρχική φιάλη και το διηθητικό χάρτη αρκετές φορές με εξάνιο. Συλλέγουμε το διήθημα και το διαλύτη της πλύσεως εντός δευτέρας σφαιρικής φιάλης, η οποία έχει προηγουμένως ξηρανθεί και ζυγισθεί με ακρίβεια 1 mg.

2.8. Απομάκρυνση του διαλύτου και ζύγιση του εκχυλίσματος

Απομακρύνουμε το μεγαλύτερο μέρος του διαλύτου δι' αποστάξεως επί ηλεκτρικώς θερμαινόμενου λουτρού. Απομακρύνουμε τα τελευταία ίχνη του διαλύτου θερμαίνοντας τη φιάλη μέσα σε φούρνο στους 103 ± 2 °C για 20 λεπτά. Διευκολύνουμε την απομάκρυνση αυτή είτε δι' εμψύσεως, κατά διαλείμματα αέρος, ή προτιμότερο αδρανούς αερίου, είτε διά μειώσεις της πίεσεως.

Αφήνουμε τη φιάλη να ψυχθεί μέσα σε ξηραντήρα επί μια τουλάχιστον ώρα και ζυγίζουμε με ακρίβεια 1 mg.

Θερμαίνουμε εκ νέου για 10 λεπτά με τις ίδιες συνθήκες, ψύχουμε μέσα στον ξηραντήρα και ζυγίζουμε.

Η διαφορά μεταξύ των δύο ζυγίσεων δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 10 mg. Αν όχι, θερμαίνουμε εκ νέου για διάστημα 10 λεπτών, ψύχουμε και ζυγίζουμε, επαναλαμβάνοντας την εργασία μέχρις ότου η διαφορά βάρους μεταξύ δύο ζυγίσεων να μην είναι μεγαλύτερη από 10 mg. Λαμβάνουμε υπόψη την τελευταία ζύγιση της φιάλης.

Εκτελούμε δύο προσδιορισμούς επί του αυτού δείγματος δοκιμής.

3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

3.1. Τρόπος υπολογισμού και τύπος

α) Το εκχύλισμα εκπεφρασμένο επί τοις εκατό κατά μάζα του προϊόντος ως έχει, ισούται με:

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

▼B

όπου: S = είναι το ποσοστό επί τοις % κατά μάζα του εκχυλίσματος του προϊόντος ως έχει,

m_0 = είναι η μάζα, σε γραμμάρια, της ποσότητας δοκιμής,

m_1 = είναι η μάζα, σε γραμμάρια, του εκχυλίσματος μετά την ξήρανση.

Λαμβάνουμε ως αποτέλεσμα τον αριθμητικό μέσο όρο των δύο προσδιορισμών εφόσον πληρούνται οι προϋποθέσεις επαναληπτικότητας.

Εκφράζουμε το αποτέλεσμα με ένα δεκαδικό ψηφίο.

β) Το εκχύλισμα ανάγεται επί ξηράς ουσίας με τον ακόλουθο τύπο:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{εκχύλισμα επί τοις εκατό λιπαρό ξηρό.}$$

όπου: S = είναι το ποσοστό κατά μάζα του εκχυλίσματος του προϊόντος ως έχει [βλέπε στοιχείο α)],

U = είναι η περιεκτικότης σε υγρασία και πτητικές ύλες.

3.2. Επαναληπτικότητας

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο προσδιορισμών, οι οποίοι πραγματοποιούνται συγχρόνως ή ταχέως ο ένας μετά τον άλλο από τον ίδιο αναλύτη, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,2 g εκχυλίσματος εξανίου ανά 100 g δείγματος.

Σε αντίθετη περίπτωση, επαναλαμβάνουμε την ανάλυση με δύο άλλες ποσότητες δοκιμής. Αν και πάλι η διαφορά υπερβαίνει τα 0,2 g, λαμβάνουμε ως αποτέλεσμα τον αριθμητικό μέσο όρο των τεσσάρων πραγματοποιηθέντων προσδιορισμών.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVI

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΙΩΔΙΟΥ

1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

► **C1** Η διεθνής αυτή προδιαγραφή περιγράφει ◀ μέθοδο προσδιορισμού του αριθμού ιωδίου στα ζωικά και φυτικά λίπη και έλαια το οποία αναφέρονται στο εξής ως λιπαρές ουσίες.

2. ΟΡΙΣΜΟΣ

► **C1** Για τους σκοπούς της παρούσης διεθνούς προδιαγραφής ◀ εφαρμόζεται ο ακόλουθος ορισμός:

- 2.1. Αριθμός ιωδίου· η μάζα του ιωδίου που απορροφάται από το δείγμα υπό τις συνθήκες εργασίας που καθορίζονται στο παρόν διεθνές πρότυπο.

Ο αριθμός ιωδίου εκφράζεται σε γραμμάρια ιωδίου ανά 100 g δείγματος.

3. ΑΡΧΗ

Διάλυση του δείγματος στο διαλύτη και προσθήκη αντιδραστήριου Wijs. Προσθήκη μετά την πάροδο καθορισμένου χρόνου διαλύματος ιωδιούχου καλίου και νερού και τιτλοδότηση του ιωδίου που ελευθερώθηκε με διάλυμα θειοθειικού νατρίου.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι ανεγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας.

- 4.1. Ιωδιούχο κάλιο, διάλυμα 100 g/l, απαλλαγμένο ιωδικών ιόντων ή ελευθέρου ιωδίου.

4.2. Διάλυμα αμύλου

Αναμειγνύονται 5 g διαλυτού αμύλου με 30 ml ύδατος, το μείγμα διαλύεται με 1 000 ml ζέοντος ύδατος, ζέεται επί 3 λεπτά και αφήνεται να ψυχθεί.

- 4.3. Θειοθειικό νάτριο, πρότυπο διάλυμα C ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) = 0,1 mol/l, το οποίο έχει τιτλοδοτηθεί το πολύ 7 ημέρες πριν από τη χρήση.

- 4.4. Διαλύτης, για την παρασκευή του οποίου αναμείχθηκαν ίσοι όγκοι κυκλοεξανίου και οξικού οξέος.

- 4.5. Αντιδραστήριο Wijs, ήτοι διάλυμα μονοχλωριούχου ιωδίου σε οξικό οξύ. Χρησιμοποιείται αντιδραστήριο Wijs του εμπορίου.

Σημείωση: Το αντιδραστήριο περιέχει 9 g ICl_3 + 9 g I σε οξικό οξύ.

5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΚΕΥΗ

Συνήθη εργαστηριακά όργανα και σκεύη και ιδίως τα κατωτέρω:

- 5.1. Γυάλινα κοχλιάρια ζυγίσεως κατάλληλα για την ελεγχόμενη ποσότητα και για την εισαγωγή της στις φιάλες (5.2).

- 5.2. Κωνικές φιάλες χωρητικότητας 500 ml με εσφυρισμένα πόματα και τελείως ξηρές.

6. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ

Το ομογενοποιημένο δείγμα ξηραίνεται με θειικό νάτριο και διηθείται.

7. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

7.1. Βάρος δείγματος

Το βάρος του δείγματος ποικίλλει ανάλογα με τον αναμενόμενο αριθμό ιωδίου όπως προκύπτει από τον πίνακα 1.



Πίνακας 1

Αναμενόμενος αριθμός ιωδίου	Βάρος δείγματος (g)
μικρότερος από 5	3,00
5 έως 20	1,00
21 έως 50	0,40
51 έως 100	0,20
101 έως 150	0,13
151 έως 200	0,10

Το δείγμα ζυγίζεται με προσέγγιση 0,1 mg στο γυάλινο κοχλιάριο ζυγίσεως (5.1).

7.2. Ποσοτικός προσδιορισμός

Το ζυγισθέν δείγμα φέρεται σε κωνική φιάλη των 500 ml (5.2). Προστίθενται 20 ml διαλύτη (4.4) για τη διάλυση της λιπαράς ουσίας. Ακολούθως προστίθενται επακριβώς 25 ml αντιδραστηρίου Wijs (4.5), τοποθετείται το πώμα, η φιάλη ανακινείται και τοποθετείται σε σκοτεινό μέρος. Για τη λήψη του αντιδραστηρίου Wijs δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί σιφόνιο που απαιτεί αναρρόφηση με το στόμα.

Κατά τον ίδιο τρόπο παρασκευάζεται το τυφλό διάλυμα με διαλύτη και αντιδραστήριο αλλά χωρίς δείγμα.

Για τα δείγματα των οποίων η τιμή ιωδίου είναι μικρότερη από 150, οι φιάλες αφήνονται σε σκοτεινό μέρος επί 1 ώρα. Όταν πρόκειται για δείγματα με αριθμό ιωδίου μεγαλύτερο από 150 και για πολυμερισμένα προϊόντα ή προϊόντα με σημαντικό βαθμό οξείδωσης, οι φιάλες αφήνονται σε σκοτεινό μέρος επί 2 ώρες.

Μετά την πάροδο του απαιτούμενου χρόνου προστίθενται σε καθεμία από τις φιάλες 20 ml διαλύματος ιωδισύχου καλίου (4.1) και 150 ml νερού.

Ακολουθεί ογκομέτρηση με το πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου (4.3) έως ότου εξαφανισθεί σχεδόν τελείως το κίτρινο χρώμα που οφείλεται στο ιώδιο. Προστίθενται λίγες σταγόνες διαλύματος αμύλου (4.2) και η ογκομέτρηση συνεχίζεται μέχρι την πρώτη εξαφάνιση του κυανού χρώματος μετά από ισχυρή ανάδευση.

Σημείωση: Ο ποτενσιομετρικός προσδιορισμός του τέλους της αντιδράσεως επιτρέπεται.

7.3. Αριθμός προσδιορισμών

Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο ποσοτικοί προσδιορισμοί.

8. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο αριθμός ιωδίου δίδεται από τον ακόλουθο τύπο:

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

όπου:

c = η αριθμητική τιμή της ακριβούς συγκεντρώσεως, σε mol ανά λίτρο, του προτύπου διαλύματος θειοθειικού νατρίου (4.3) που χρησιμοποιήθηκε,

V₁ = η αριθμητική τιμή του όγκου, σε ml, του προτύπου διαλύματος θειοθειικού νατρίου (4.3) που χρησιμοποιήθηκε για την τυφλή δοκιμασία,

▼B

V_2 = η αριθμητική τιμή του όγκου, σε ml, του προτύπου διαλύματος θειοθειικού νατρίου (4.3) που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό,

m = η αριθμητική τιμή της μάζας, σε g, του δείγματος (7.1).

Λαμβάνεται ως αποτέλεσμα ο αριθμητικός μέσος όρος των δύο προσδιορισμών, υπό την προϋπόθεση ότι τηρούνται οι απαιτήσεις όσον αφορά την επαναληψιμότητα.

▼ **M11***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVII***ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΤΙΓΜΑΣΤΑΔΙΕΝΙΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΛΑΙΑ****1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Προσδιορισμός των στιγματαδιενίων σε φυτικά έλαια χαμηλής περιεκτικότητας στους εν λόγω υδρογονάνθρακες, κυρίως σε παρθένα ελαιόλαδα και σε ακατέργαστα πυρηνέλαια.

2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος είναι εφαρμόσιμη για όλα τα φυτικά έλαια, οι μετρήσεις όμως είναι αξιόπιστες μόνον όταν η περιεκτικότητα του ελαίου στους εν λόγω υδρογονάνθρακες περιλαμβάνεται μεταξύ των τιμών 0,01 και 4,0 mg/kg. Η μέθοδος προσφέρεται κυρίως για την ανίχνευση της παρουσίας εξευγενισμένων (ραφιναρισμένων) φυτικών ελαίων (ελαιολάδων, πυρηνελαίων, ηλιανθελαίων, φοινικελαίων, κ.λπ.) στο παρθένο ελαιόλαδο, αφού τα εξευγενισμένα έλαια περιέχουν στιγμασταδιένια ενώ τα παρθένα όχι.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Απομόνωση των ασαπωνοποιητών υλών, διαχωρισμός του κλάσματος στεροειδών υδρογονανθράκων με χρωματογραφία στήλης επί πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) και ανάλυση με αέριο χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης.

4. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- 4.1. Φιάλες των 250 ml με επίπεδο πυθμένα κατάλληλες για χρήση με ψυκτήρα αναρροής.
- 4.2. Διαχωριστικές χοάνες των 500 ml.
- 4.3. Σφαιρικές φιάλες των 100 ml.
- 4.4. Περιστροφικός εξατμιστήρας.
- 4.5. Υάλινη στήλη χρωματογραφίας εσωτερικής διαμέτρου 1,5-2,0 cm και μήκους 50 cm, με στρόφιγγα Teflon και βύσμα από υαλοβάμβακα ή δίσκο από συντετηγμένο γυαλί στον πυθμένα. Για να ετοιμαστεί η στήλη silica gel, εισάγεται μέσα στην υάλινη στήλη εξάνιο μέχρι ύψους 5 cm περίπου και εν συνεχεία η στήλη πληρούται με υδαρές μείγμα silica gel και εξανίου (15 g σε 40 ml) το οποίο προστίθεται τμηματικά. Το περιεχόμενο της στήλης αφήνεται σε ηρεμία και η καθίζηση ολοκληρώνεται με ελαφρά ανατάραξη. Προστίθεται άνυδρο θειικό νάτριο μέχρι ύψους 0,5 cm περίπου και τέλος εκλούεται η περίσσεια εξανίου.
- 4.6. Χρωματογράφος αερίου με ανιχνευτή ιονισμού δια φλογός, split ή διάταξη έγχυσης εν ψυχρώ, ενσωματωμένη στη στήλη και κλίβανος προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας με ακρίβεια ± 1 °C.
- 4.7. Τριχοειδής στήλη από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου για αέριο χρωματογραφία (εσωτερικής διαμέτρου 0,25 ή 0,30 mm και μήκους 25 m), με επίστρωση από 5 % - φαινυλομεθυλοσιλικόνη πάχους 0,25 mm.

Σημείωση 1.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες στήλες ανάλογης ή μικρότερης πολικότητας.

- 4.8. Καταγραφέας-ολοκληρωτής με δυνατότητα ολοκλήρωσης κοιλάδα προς κοιλάδα.
- 4.9. Μικροσύριγγα των 5-10 ml για αέριο χρωματογραφία με σκληρυμμένη βελόνη.
- 4.10. Ηλεκτρικό θερμαντήρα ή εστία.

▼ **M11**

5. ANΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας, εκτός εάν διευκρινίζεται διαφορετικά. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο ή τουλάχιστον ισοδύναμης καθαρότητας.

- 5.1. Εξάνιο ή μείγμα αλκανίων σημείου ζέσεως 65-70 °C, αποσταζόμενο σε αποστακτική ύλη.

Σημείωση 2.

Ο διαλύτης πρέπει να αποστάζεται ώστε να απομακρύνονται οι ξένες προσμείξεις.

- 5.2. Αιθανόλη 96 κ.ό.

- 5.3. Άνυδρο θειικό νάτριο.

- 5.4. Αλκοολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου 10 %. Προστίθενται 10 ml ύδατος σε 50 g υδροξειδίου του καλίου, το διάλυμα αναδεύεται και εν συνεχεία αραιώνεται με αιθανόλη μέχρις όγκου 500 ml.

Σημείωση 3.

Το αλκοολικό διάλυμα ποτάσας γίνεται φαιόχρουν όσο παραμένει· γι' αυτό πρέπει να παρασκευάζεται σε ημερήσια βάση και να φυλάσσεται σε καλώς πωματισμένες σκούρες υάλινες φιάλες.

- 5.5. Silica gel 60 για χρωματογραφία στήλης, άνοιγμα βροχίδων 70-230 (αριθ. αναφ. Merck 7734 ή ανάλογος).

Σημείωση 4.

Η silica gel μπορεί συνήθως να χρησιμοποιείται απευθείας από το δοχείο χωρίς προηγούμενη επεξεργασία. Ωστόσο, μερικές παρτίδες ενδέχεται να παρουσιάσουν χαμηλού βαθμού δραστηριότητα με αποτέλεσμα κακής ποιότητας χρωματογραφικό διαχωρισμό. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η επεξεργασία της silica gel πρέπει να γίνεται με τον ακόλουθο τρόπο: αποενεργοποιείται η silica gel με θέρμανση επί τέσσερις τουλάχιστον ώρες σε θερμοκρασία 550 °C. Μετά τη θέρμανση, τοποθετείται σε ξηραντήρα ενόσω ψύχεται, και εν συνεχεία μεταφέρεται σε πωματισμένη φιάλη. Προστίθεται 2 % ύδατος και η φιάλη αναταράσσεται μέχρις ότου δεν υπάρχουν πλέον σβώλοι, αλλά σκόνη που αιωρείται ελεύθερα.

Εάν από διάφορες παρτίδες silica gel ληφθούν χρωματογραφήματα με αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές, η επεξεργασία της πρέπει να γίνει κατά τον ανωτέρω περιγραφόμενο τρόπο. Μια άλλη λύση θα ήταν να χρησιμοποιηθεί silica gel 60 εξαιρετικής καθαρότητας (αριθ. αναφ. Merck 7754).

- 5.6. Μητρικό διάλυμα (200 ppm) χολησταδιενί-3,5-ου (Sigma, καθαρότητας 99 %) σε εξάνιο (10 mg σε 50 ml).

- 5.7. Πρότυπο διάλυμα (συγκεντρώσεως 20 ppm) χολησταδιενί-3,5-ου σε εξάνιο, λαμβανόμενο με αραιώση του ανωτέρω διαλύματος.

Σημείωση 5.

Διατηρούμενα σε θερμοκρασία κατώτερη των 4 °C, τα διαλύματα των σημείων 5.6 και 5.7 μπορούν να παραμείνουν αναλλοίωτα επί τέσσερις τουλάχιστον μήνες.

- 5.8. Διάλυμα n-εικοσιεννεανενίου σε εξάνιο συγκεντρώσεως περίπου 100 ppm.

- 5.9. Φέρον αέριο για χρωματογραφία: ήλιο ή υδρογόνο καθαρότητας 99,9990 %.

- 5.10. Βοηθητικά αέρια για ανιχνευτή ιονισμού διά φλογός: υδρογόνο καθαρότητα 99,9990 % και καθαρισμένος αέρας.

▼ **M11****6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ****6.1. Προετοιμασία των ασαπωνοποιητών υλών:**

6.1.1. Ζυγίζονται $20 \pm 0,1$ g ελαίου μέσα σε φιάλη των 250 ml (σημείο 4.1), προστίθεται 1 ml πρότυπου διαλύματος χολησταδιενί-3,5-ου (20mg) και 75 ml αλκοολικού διαλύματος ποτάσας 10 %, συναρμολογείται ο ψυκτήρας αναρροής και ακολουθεί θέρμανση μέχρι ελαφρού βρασμού επί 30 λεπτά. Απομακρύνεται η φιάλη που περιέχει το δείγμα από τη θερμότητα και το διάλυμα αφήνεται να ψυχθεί ελαφρά (το διάλυμα δεν αφήνεται να ψυχθεί εντελώς γιατί τότε το δείγμα θα στερεοποιηθεί). Προστίθενται 100 ml ύδατος και το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη (σημείο 4.2) με τη βοήθεια 100 ml εξανίου. Το μείγμα ανακινείται ζοηρώς επί 30 δευτερόλεπτα και αφήνεται να ηρεμήσει μέχρι να σχηματισθούν οι στιβάδες.

Σημείωση 6.

Εάν σχηματισθεί γαλάκτωμα το οποίο διατηρείται, προστίθενται μικρές ποσότητες αιθανόλης.

6.1.2. Η υποκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε δεύτερη διαχωριστική χοάνη και εκχυλίζεται εκ νέου με 100 ml εξανίου. Αφήνεται να εκρεύσει για μια ακόμη φορά η κατώτερη φάση και εκπλύνονται τα εκχυλίσματα εξανίου (συνδυαζόμενα σε μια άλλη διαχωριστική χοάνη) τρεις φορές με 100 ml μείγματος αιθανόλης-ύδατος (1: 1) κάθε φορά, μέχρις ότου επιτευχθεί ουδέτερο pH.

6.1.3. Το διάλυμα εξανίου διαβιβάζεται μέσω άνυδρου θεικού νατρίου (50 g), εκπλύνεται με 20 ml εξανίου και εξατμίζεται μέχρι ξηράνσεως μέσα σε περιστροφικό εξατμιστήρα σε θερμοκρασία 30 °C και υπό χαμηλή πίεση.

6.2. Διαχωρισμός του κλάσματος στεροειδών υδρογονανθράκων:

6.2.1. Το υπόλειμμα φέρεται στην κλασματική στήλη με τη βοήθεια δύο δόσεων εξανίου του 1 ml η καθεμία, αφήνεται το δείγμα να εκρεύσει επί της στήλης με ταπείνωση της στάθμης του διαλύματος μέχρι της ανωτάτης στάθμης του θεικού νατρίου και αρχίζει η χρωματογραφική έκλουση με εξάνιο με ταχύτητα ροής ίση προς 1 ml/min περίπου. Απορρίπτονται τα πρώτα 25-30 ml του εκλούσματος και συλλέγονται τα επόμενα 40 ml. Το κλάσμα αυτό μεταγγίζεται σε σφαιρική φιάλη των 100 ml.

Σημείωση 7.

Το πρώτο κλάσμα περιέχει κορεσμένους υδρογονάνθρακες (σχήμα 1α) και το δεύτερο κλάσμα περιέχει τους στεροειδείς. Με περαιτέρω έκλουση λαμβάνεται ο υδρογονάνθρακας squalene και συνεχείς ενώσεις. Για να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ κορεσμένων και στεροειδών υδρογονανθράκων, οι όγκοι των κλασμάτων πρέπει να είναι οι καταλληλότεροι δυνατοί. Προς τούτο, ο όγκος του πρώτου κλάσματος πρέπει να προσαρμόζεται κατά τρόπον ώστε, κατά την ανάλυση του δεύτερου κλάσματος, οι κορυφές που αντιστοιχούν στους κορεσμένους υδρογονάνθρακες να είναι χαμηλές (βλέπε σχήμα 1γ)· αν δεν εμφανισθούν, αλλά η ένταση της κορυφής του πρότυπου διαλύματος είναι χαμηλή, τότε ο όγκος πρέπει να ελαττώνεται. Πάντως, δεν χρειάζεται να γίνεται πλήρης διαχωρισμός μεταξύ των συστατικών του πρώτου και του δεύτερου κλάσματος, αφού κατά την ανάλυση με αέριο χρωματογραφία δεν γίνεται αλληλεπικάλυψη κορυφών, εφόσον έχουν τηρηθεί οι συνθήκες αερίου χρωματογραφίας που αναφέρονται στο σημείο 6.3.1. Ούτε χρειάζεται κατά κανόνα να επιτυγχάνεται ο καταλληλότερος όγκος του δεύτερου κλάσματος, αφού με τα περαιτέρω συστατικά γίνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός. Παρ' όλα αυτά, μια υψηλή κορυφή που σημειώνεται σε χρόνο κατακράτησης χαμηλότερο κατά 1,5 min περίπου από τον αντίστοιχο του πρότυπου διαλύματος οφείλεται στον υδρογονάνθρακα squalene και είναι ενδεικτική μη ικανοποιητικού διαχωρισμού.

6.2.2. Το δεύτερο κλάσμα εξατμίζεται μέχρι ξηράνσεως μέσα σε εξατμιστήρα σε θερμοκρασία 30 °C και υπό χαμηλή πίεση, και αμέσως, μετά διαλύεται το υπόλειμμα σε 0,2 ml εξανίου. Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο μέχρις ότου αναλυθεί.

Σημείωση 8.

Τα υπολείμματα των σημείων 6.1.3 και 6.2.2 δεν πρέπει να παραμένουν ξηρά και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μόλις ληφθούν, πρέπει να προστίθεται ο διαλύτης και εν συνεχεία να φυλάσσονται στο ψυγείο.

▼ **M11****6.3. Αέριος χρωματογραφία:****6.3.1. Συνθήκες εργασίας για διάταξη έγχυσης split:**

- Θερμοκρασία στη διάταξη έγχυσης: 300 °C.
- Θερμοκρασία ανιχνευτή: 320 °C.
- Καταγραφέας-ολοκληρωτής: οι παράμετροι ολοκλήρωσης πρέπει να καθορίζονται κατά τρόπον ώστε ο υπολογισμός των εμβαδών να είναι ακριβής. Συνιστάται η ολοκλήρωση κοιλάδα προς κοιλάδα.
- Ευαισθησία: το δεκαεξαπλάσιο περίπου της ελάχιστης εξασθένησης.
- όγκος εγχέομενου διαλύματος: 1ml.
- Θερμοκρασίες προγραμματισμού του κλιβάνου: αρχικά 235 °C επί 6 min και εν συνεχεία αύξηση κατά 2 °C/min μέχρι θερμοκρασίας 285 °C.
- Έγχυση με μερισμό ροής: 1: 15.
- Φέρον αέριο: ήλιο ή υδρογόνο υπό πίεση 120 kPa περίπου.

Οι συνθήκες αυτές μπορούν να προσαρμόζονται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του χρωματογράφου και της στήλης, κατά τρόπον ώστε τα λαμβανόμενα χρωματογραφήματα να πληρούν τους ακόλουθους όρους: ο χρόνος κατακράτησης του διαλύματος εσωτερικού προτύπου θα αντιστοιχεί προς τους χρόνους που εμφανίζονται στο σημείο 6.3.2 με ακρίβεια ± 5 min· η κορυφή του διαλύματος εσωτερικού προτύπου θα αντιστοιχεί προς το 80 % τουλάχιστον της πλήρους κλίμακας.

Το σύστημα αέριας χρωματογραφίας πρέπει να ελέγχεται με έγχυση μείγματος από το μητρικό διάλυμα χολησταδιενίου (σημείο 5.6) και το διάλυμα n-εικοσιεννεανίου (σημείο 5.8). Η κορυφή που αντιστοιχεί στο χολησταδιέν-3,5-ιο πρέπει να εμφανίζεται πριν από την κορυφή που αντιστοιχεί στο n-εικοσιεννεάνιο (σχήμα 1γ)· εάν αυτό δεν συμβεί, υπάρχουν δύο λύσεις: να μειωθεί η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου ή/και να χρησιμοποιηθεί στήλη αερίου χρωματογραφίας μικρότερης πολικότητας.

6.3.2. Ταυτοποίηση των κορυφών του φάσματος.

Η κορυφή του διαλύματος εσωτερικού προτύπου εμφανίζεται στα 19 min περίπου και το στιγμασταδιέν-3,5-ιο σε σχετικό χρόνο κατακράτησης ίσο προς 1,29 (βλέπε σχήμα 1β). Το στιγμασταδιέν-3,5-ιο συνοδεύεται από μικρές ποσότητες ισομερών και, συνήθως, εμφανίζονται και τα δύο ως μία κορυφή χρωματογραφήματος. Παρόλα αυτά, εάν η στήλη είναι πολύ πολική ή έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, το ισομερές μπορεί να εμφανίζεται ως μικρή κορυφή πριν και πολύ κοντά στην κορυφή του στιγμασταδιέν-3,5-ίου (σχήμα 2). Για να εξασφαλιστεί η έκλυση των στιγμασταδιενίων σε μία κορυφή συνιστάται η αντικατάσταση της στήλης με άλλη μικρότερης πολικότητας ή μεγαλύτερης εσωτερικής διαμέτρου.

Σημείωση 9.

Στιγμασταδιένια αναφοράς μπορούν να ληφθούν από την ανάλυση ενός εξεργενισμένου φυτικού ελαίου με τη χρησιμοποίηση μικρότερης ποσότητας δείγματος (1-2 g). Τα στιγμασταδιένια εμφανίζονται ως ευμεγέθους κορυφή που ταυτοποιείται εύκολα.

6.3.3. Ποσοτικός προσδιορισμός

Η περιεκτικότητα σε στιγμασταδιένιο προσδιορίζεται βάσει του τύπου:

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

▼M11

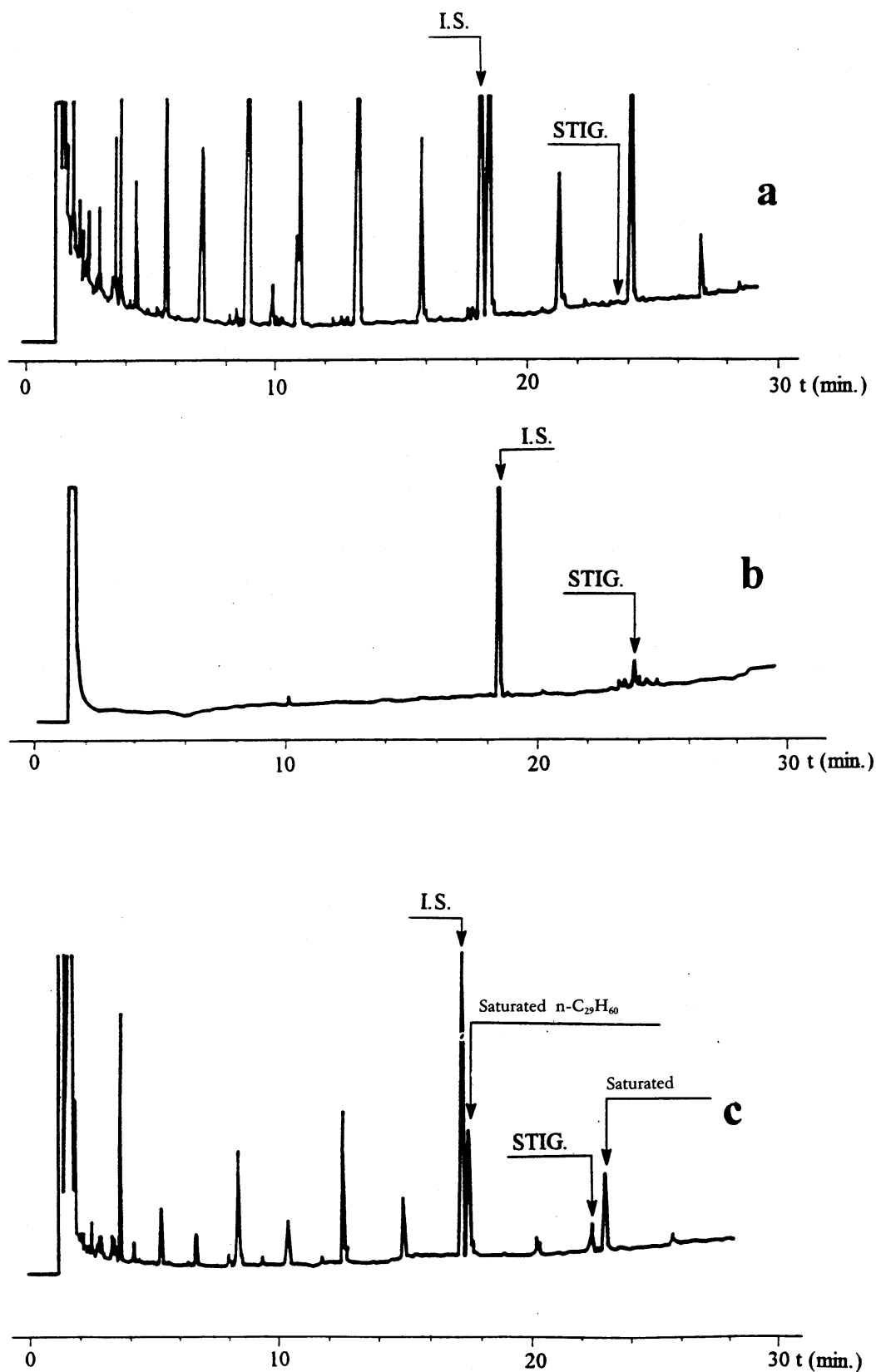
όπου: A_b = εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο στιγμασταδένιο (εάν η κορυφή αυτή χωρίζεται σε δύο, άθροισμα των εμβαδών που αντιστοιχούν στα δύο ισομερή)

A_c = εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (χολησταδένιο)

M_c = μάζα (σε mg) του προστιθέμενου προτύπου

M_o = μάζα (σε g) του δείγματος ελαίου.

Το όριο ανίχνευσης κυμαίνεται γύρω από την τιμή 0,01 mg/kg.

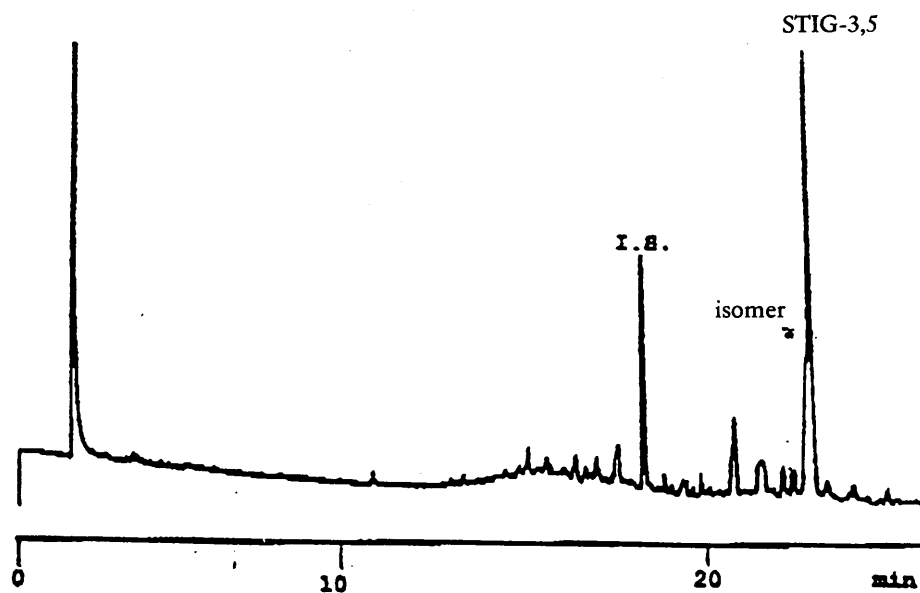
▼ M11

Σχήμα 1

Χρωματογραφήματα αερίου ληφθέντα από δείγματα ελαιολάδου που αναλύθηκαν σε τριχοειδή στήλη (εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και μήκους 25 m) από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, επιχρισμένη με 5%-φαινυλομεθυλοσιλικόνη πάχους 0,25 mm.

▼ M11

- α) Πρώτο κλάσμα (30 ml) από παρθένο ελαιόλαδο, ενισχυμένο με το πρότυπο διάλυμα.
- β) Δεύτερο κλάσμα (40 ml) από ελαιόλαδο που περιέχει στιγμασταδιένια σε αναλογία 0,10 mg/kg.
- γ) Δεύτερο κλάσμα (40 ml) που περιέχει μικρό ποσοστό του πρώτου κλάσματος.



Σχήμα 2

Χρωματογράφημα αερίου από δείγμα εξευγενισμένου ελαιολάδου που αναλύεται στη στήλη DB-5, το οποίο δείχνει το ισομερές του στιγμασταδιεν-3,5-ίου.

▼ **M25***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVIII***ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΤΡΙΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΕΣ ΜΕ ECN 42****1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ**

Προσδιορισμός της απόλυτης διαφοράς μεταξύ των πειραματικών τιμών περιεκτικότητας σε τριακυλογλυκερόλες (TAG) με ισοδύναμο αριθμό ατόμων άνθρακα ίσο με 42 (ECN42_{HPLC}), οι οποίες προσδιορίζονται στο έλαιο με υγροχρωματογραφία υψηλής επίδοσης (HPLC), και της θεωρητικής τιμής TAG με ισοδύναμο αριθμό ατόμων άνθρακα ίσο με 42 (ECN 42_{θεωρητικό}), η οποία υπολογίζεται βάσει της σύστασης σε λιπαρά οξέα.

2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Το πρότυπο ισχύει για το ελαιόλαδο. Η μέθοδος εφαρμόζεται για την ανίχνευση της παρουσίας μικρών ποσοτήτων σπορελαίων (πλούσιων σε λινοελαϊκό οξύ) σε οποιαδήποτε κατηγορία ελαιολάδου.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στα γνήσια ελαιόλαδα η περιεκτικότητα σε τριακυλογλυκερόλες με ECN 42, προσδιοριζόμενη με ανάλυση HPLC, και η θεωρητική περιεκτικότητα σε τριακυλογλυκερόλες με ECN 42 (υπολογιζόμενη βάσει της σύστασης σε λιπαρά οξέα, η οποία προσδιορίζεται με χρωματογραφία αερίου-υγρού) συμπίπτουν εντός ενός ορίου. Διαφορές μεγαλύτερες από τις τιμές που έχουν υιοθετηθεί για κάθε τύπο ελαιολάδου υποδηλώνουν ότι το ελαιόλαδο περιέχει σπορέλαια.

4. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η μέθοδος υπολογισμού της θεωρητικής περιεκτικότητας σε τριακυλογλυκερόλες με ECN 42, καθώς και της διαφοράς σε σχέση με τα δεδομένα που προκύπτουν από την HPLC, συνίσταται ουσιαστικά στον συντονισμό αναλυτικών δεδομένων που έχουν ληφθεί με άλλες μεθόδους. Διακρίνονται τρεις φάσεις: προσδιορισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα με χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης, υπολογισμός της θεωρητικής σύστασης σε τριακυλογλυκερόλες με ECN 42, προσδιορισμός των τριακυλογλυκερολών με ECN 42.

4.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

- 4.1.1. Σφαιρικές φιάλες των 250 και 500 ml.
- 4.1.2. Ποτήρια ζέσεως των 100 ml.
- 4.1.3. Γυάλινη χρωματογραφική στήλη, εσωτερικής διαμέτρου 21 mm και μήκους 450 mm, με στρόφιγγα και τυποποιημένο κωνικό άκρο (θηλυκό) στην κορυφή.
- 4.1.4. Διαχωριστικές χόανες των 250 ml, με τυποποιημένο κωνικό άκρο (αρσενικό) στον πυθμένα, κατάλληλο για σύνδεση με την κορυφή της στήλης.
- 4.1.5. Γυάλινη ράβδος μήκους 600 mm.
- 4.1.6. Γυάλινο χωνί διαμέτρου 80 mm.
- 4.1.7. Ογκομετρικές φιάλες των 50 ml.
- 4.1.8. Ογκομετρικές φιάλες των 20 ml.
- 4.1.9. Περιστροφικός εξεταστήρας
- 4.1.10. Υγροχρωματογράφος υψηλής επίδοσης, με δυνατότητα θερμοστατικού ελέγχου της θερμοκρασίας της στήλης.
- 4.1.11. Διατάξεις εισαγωγής δείγματος για παροχή 10 μl.
- 4.1.12. Ανιχνευτής: διαφορικό διαθλασίμετρο. Η ευαισθησία πλήρους κλίμακας θα πρέπει να ισούται τουλάχιστον με 10^{-4} μονάδες δείκτη διάθλασης.

▼ **M25**

4.1.13. Στήλη: σωλήνας από ανοξείδωτο χάλυβα, διαστάσεων 250 mm (μήκος) x 4,5 mm (εσωτερική διάμετρος), πληρωμένος με διοξείδιο του πυριτίου που περιέχει 22 έως 23 % άνθρακα σε μορφή δεκαοκτοκυκλοσιλανίου, διαμέτρου σωματιδίων 5 µm.

4.1.14. Λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων.

4.1.15. Φιαλίδια των 2 ml περίπου, με διάφραγμα (septum) επιστρωμένο με Teflon και βιδωτό πώμα.

4.2. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια θα πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας. Οι διαλύτες έκλουσης θα πρέπει να έχουν απαερωθεί και είναι δυνατόν να ανακυκλώνονται επανειλημμένα, χωρίς αυτό να έχει επίδραση στους διαχωρισμούς.

4.2.1. Πετρελαϊκός αιθέρας, κλάσμα 40-60 °C, χρωματογραφικής καθαρότητας, ή εξάνιο.

4.2.2. Αιθυλαιθέρας, χωρίς υπεροξειδία, πρόσφατα αποσταγμένος.

4.2.3. Διαλύτης έκλουσης για τον καθαρισμό του ελαίου με χρωματογραφία στήλης: μείγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθυλαιθέρα 87:13 (v/v).

4.2.4. Πυριτική πηκτή (silica gel) με κόκκους μεγέθους 70-230 mesh, τύπου Merck 7734, με τυποποιημένο ποσοστό υγρασίας 5 % (w/w).

4.2.5. Υαλοβάμβακας.

4.2.6. Ακετόνη για HPLC.

4.2.7. Ακετονιτρίλιο ή προπιονιτρίλιο για HPLC.

4.2.8. Διαλύτης έκλουσης HPLC: μείγμα ακετονιτρίλιου-ακετόνης (οι αναλογίες ρυθμίζονται κατά τρόπο ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός· εκκίνηση με μείγμα 50:50) ή προπιονιτρίλιο.

4.2.9. Διαλύτης διαλυτοποίησης: ακετόνη

4.2.10. Τριγλυκερίδια αναφοράς: είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τριγλυκερίδια του εμπορίου (τριπαλμιτίνη, τριελαΐνη κ.λπ.) και στη συνέχεια να χαραχθεί καμπύλη των χρόνων κατακράτησης συναρτήσει του ισοδύναμου αριθμού ατόμων άνθρακα ή, εναλλακτικά, να χρησιμοποιηθούν χρωματογραφήματα αναφοράς που έχουν ληφθεί με σογιέλαιο, μείγμα σογιελαίου-ελαιολάδου σε αναλογία 30:70 και καθαρό ελαιολάδο (βλέπε σημειώσεις 1 και 2 και σχήματα 1 έως 4).

4.2.11. Στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) των 6 ml, με 1 g διοξειδίου του πυριτίου ως στερεά φάση.

4.3. Προετοιμασία του δείγματος

Δεδομένου ότι είναι δυνατόν να ληφθούν ψευδοθετικά αποτελέσματα λόγω της παρουσίας ορισμένων παρεμποδίζουσών ουσιών, το δείγμα πρέπει να υποβάλλεται πάντα σε καθαρισμό σύμφωνα με τη μέθοδο 2.507 της IUPAC, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των πολικών ενώσεων στις λιπαρές ύλες για τηγάνισμα.

4.3.1. Ετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης

Πληρούται η στήλη (4.1.3.) με περίπου 30 ml διαλύτη έκλουσης (4.2.3.) και έπειτα εισάγεται σε αυτή υαλοβάμβακας (4.2.5.), ωθούμενος προς τον πυθμένα της με τη βοήθεια της γυάλινης ράβδου (4.1.5.).

Σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml παρασκευάζεται εναιώρημα 25 g πυριτικής πηκτής (4.2.4.) σε 80 ml μείγματος έκλουσης (4.2.3.), το οποίο μεταγγίζεται κατόπιν στη στήλη με γυάλινο χωνί (4.1.6.).

Για να εξασφαλιστεί η πλήρης μετάγγιση της πυριτικής πηκτής στη στήλη, εκπλύνεται το ποτήρι ζέσεως με το μείγμα έκλουσης και τα εκπλύματα μεταγγίζονται επίσης στη στήλη.

Ανοίγεται η στρόφιγγα και αφήνεται ο διαλύτης να εκρεύσει από τη στήλη έως ότου η στάθμη του φθάσει σε ύψος περίπου 1 cm πάνω από την πυριτική πηκτή.

▼ **M25****4.3.2. Χρωματογραφία στήλης**

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml (4.1.7.) ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,001 g, $2,5 \pm 0,1$ g ελαίου, το οποίο έχει προηγουμένως διηθηθεί, ομοιογενοποιηθεί και, εάν είναι απαραίτητο, αφυδατωθεί.

Το έλαιο διαλύεται σε περίπου 20 ml διαλύτη έκλουσης (4.2.3.), ενδεχομένως με ελαφρά θέρμανση για να διευκολυνθεί η διάλυση. Το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ο όγκος του συμπληρώνεται με διαλύτη έκλουσης.

Με τη βοήθεια ογκομετρικού σιφωνίου εισάγονται 20 ml του διαλύματος στη στήλη που έχει ετοιμαστεί σύμφωνα με το σημείο 4.3.1. Ανοίγεται η στρόφιγγα και αφήνεται ο διαλύτης να εκρεύσει έως ότου η στάθμη του φθάσει στο ύψος της στιβάδας πυριτικής πηκτής.

Ακολουθεί έκλουση με 150 ml διαλύτη έκλουσης (4.2.3.), του οποίου η παροχή ρυθμίζεται σε περίπου 2 ml/min (για τη διέλευση των 150 ml μέσω της στήλης απαιτούνται περίπου 60-70 λεπτά).

Το έκλουσμα συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη των 250 ml (4.1.1.), προζυγισμένη σε κλίβανο, και ζυγίζεται με ακρίβεια. Απομακρύνεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση σε περιστροφικό εξατμιστήρα (4.1.9) και ζυγίζεται το υπόλειμμα, το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος προς ανάλυση με HPLC και προς παρασκευή των μεθυλεστέρων.

Το ποσοστό ανάκτησης του δείγματος από τη στήλη πρέπει να είναι τουλάχιστον 90 % για τις κατηγορίες εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, παρθένο ελαιόλαδο, εξευγενισμένο ελαιόλαδο και ελαιόλαδο και τουλάχιστον 80 % για το ελαιόλαδο λαμπάντε και το πυρηνέλαιο.

4.3.3. Καθαρισμός με SPE

Ενεργοποιείται η στήλη διοξειδίου του πυριτίου SPE με τη διέλευση 6 ml εξανίου (4.2.3) υπό κενό, με μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η ξηρότητα.

Σε φιαλίδιο των 2 ml (4.1.15) ζυγίζονται 0,12 g, με ακρίβεια 0,001 g, και διαλύονται με 0,5 ml εξανίου (4.2.3).

Εισάγεται το διάλυμα στη στήλη SPE και ακολουθεί έκλουση με 10 ml μείγματος εξανίου-διαιθυλαιθέρα (87:13, v/v) (4.2.3).

Το συλλεγόμενο κλάσμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού, σε περιστροφικό εξατμιστήρα (4.1.9), υπό ελαττωμένη πίεση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 2 ml ακετόνης (4.2.6) για ανάλυση τριακυλογλυκερολών (TAG).

4.4. Ανάλυση με HPLC**4.4.1. Προετοιμασία των δειγμάτων για χρωματογραφική ανάλυση**

Παρασκευάζεται διάλυμα 5 % του προς ανάλυση δείγματος με ζύγιση $0,5 \pm 0,001$ g δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και συμπλήρωση του όγκου με 10 ml διαλύτη διαλυτοποίησης (4.2.9).

4.4.2. Διαδικασία

Συναρμολογείται το χρωματογραφικό σύστημα. Διοχετεύεται διαλύτης έκλουσης (4.2.8) με παροχή 1,5 ml/min για τον καθαρισμό ολόκληρου του συστήματος και ακολουθεί αναμονή έως ότου σταθεροποιηθεί η γραμμή βάσης.

Εισάγονται 10 μl του δείγματος που έχει προετοιμαστεί σύμφωνα με το σημείο 4.3.

4.4.3. Υπολογισμός και έκφραση των αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιείται η μέθοδος κανονικοποίησης των εμβαδών, δηλαδή η παραδοχή ότι το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών που αντιστοιχούν στις TAG με ECN 42 έως ECN 52 ισούται με 100 %.

Η σχετική εκατοστιαία αναλογία κάθε τριγλυκεριδίου υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ τριγλυκεριδίου} = \frac{\text{εμβαδόν κορυφής}}{\text{άθροισμα εμβαδών κορυφών}} \times 100$$

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να εκφράζονται με δύο τουλάχιστον δεκαδικά ψηφία.

Βλέπε σημειώσεις 1 έως 4.

▼ M25

4.5. Υπολογισμός της σύστασης σε τριακυλογλυκερόλες (γραμμομόρια %) από δεδομένα για τη σύσταση σε λιπαρά οξέα (εμβαδόν %)

4.5.1. Προσδιορισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα

Η σύσταση σε λιπαρά οξέα προσδιορίζεται σύμφωνα με το πρότυπο ISO 5508, με τη χρήση τριχοειδούς στήλης. Οι μεθυλεστέρες παρασκευάζονται σύμφωνα με το έγγραφο COI/T.20/Doc. No 24.

4.5.2. Λιπαρά οξέα για τους υπολογισμούς

Τα γλυκερίδια χωρίζονται σε ομάδες ανάλογα με τον ισοδύναμο αριθμό ατόμων άνθρακα (ECN), λαμβανομένων υπόψη των κατωτέρω ισοδυναμιών μεταξύ ECN και λιπαρών οξέων. Έχουν ληφθεί υπόψη μόνο λιπαρά οξέα με 16 και 18 άτομα άνθρακα, επειδή είναι τα μόνα που έχουν σημασία για το ελαιόλαδο. Τα λιπαρά οξέα θα πρέπει να κανονικοποιούνται στο 100 %.

Λιπαρό οξύ	Συντομογραφία	Μοριακό βάρος (MW)	ECN
Παλμιτικό οξύ	P	256,4	16
Παλμιτελαϊκό οξύ	Po	254,4	14
Στεατικό οξύ	S	284,5	18
Ελαϊκό οξύ	O	282,5	16
Λινελαϊκό οξύ	L	280,4	14
Λινολενικό οξύ	Ln	278,4	12

4.5.3. Μετατροπή του εμβαδού % σε γραμμομόρια για όλα τα λιπαρά οξέα (1)

$$\text{γραμμομόρια. P} = \frac{\text{εμβαδόν \% P}}{\text{MW P}} \quad \text{γραμμομόρια. S} = \frac{\text{εμβαδόν \% S}}{\text{MW S}} \quad \text{γραμμομόρια. Po} = \frac{\text{εμβαδόν \% Po}}{\text{MW Po}}$$

$$\text{γραμμομόρια. O} = \frac{\text{εμβαδόν \% O}}{\text{MW O}} \quad \text{γραμμομόρια. L} = \frac{\text{εμβαδόν \% L}}{\text{MW L}} \quad \text{γραμμομόρια. Ln} = \frac{\text{εμβαδόν \% Ln}}{\text{MW Ln}}$$

4.5.4. Κανονικοποίηση των γραμμομορίων λιπαρών οξέων στο 100 % (2)

$$\text{γραμμομόρια \% P (1,2,3)} = \frac{\text{γραμμομόρια P} * 100}{\text{γραμμομόρια (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{γραμμομόρια \% S (1,2,3)} = \frac{\text{γραμμομόρια S} * 100}{\text{γραμμομόρια (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{γραμμομόρια \% Po (1,2,3)} = \frac{\text{γραμμομόρια Po} * 100}{\text{γραμμομόρια (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{γραμμομόρια \% O (1,2,3)} = \frac{\text{γραμμομόρια O} * 100}{\text{γραμμομόρια (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{γραμμομόρια \% L (1,2,3)} = \frac{\text{γραμμομόρια L} * 100}{\text{γραμμομόρια (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{γραμμομόρια \% Ln (1,2,3)} = \frac{\text{γραμμομόρια Ln} * 100}{\text{γραμμομόρια (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

Το αποτέλεσμα παρέχει την εκατοστιαία αναλογία κάθε λιπαρού οξέος, σε γραμμομόρια %, αδιακρίτως θέσης (1, 2 και 3) στις TAG.

Στη συνέχεια υπολογίζεται το άθροισμα των κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) P και S και το άθροισμα των ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFA) Po, O, L και Ln (3):

$$\text{γραμμομόρια \% SFA} = \text{γραμμομόρια \% P} + \text{γραμμομόρια \% S}$$

$$\text{γραμμομόρια \% UFA} = 100 - \text{γραμμομόρια \% SFA}$$

▼ **M25**

4.5.5. Υπολογισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα στη θέση 2 και στις θέσεις 1 και 3 των TAG

Τα λιπαρά οξέα κατανέμονται σε τρεις ομάδες ως εξής: μια ομάδα για τη θέση 2 και δύο ίδιες μεταξύ τους ομάδες για τις θέσεις 1 και 3, με διαφορετικούς συντελεστές για τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (P και S) και τα ακόρεστα (Po, O, L και Ln).

4.5.5.1. Κορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2 [P(2) και S(2)] (4)

$$\text{γραμμομρία \% P(2)} = \text{γραμμομρία \% P (1,2,3)} * 0,06$$

$$\text{γραμμομρία \% S(2)} = \text{γραμμομρία \% S (1,2,3)} * 0,06$$

4.5.5.2. Ακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση 2 [Po(2), O(2), L(2) και Ln(2)] (5):

$$\text{γραμμομρία \% Po(2)} = \frac{\text{γραμμομρία \% Po(1,2,3)}}{\text{γραμμομρία \% UFA}} * (100 - \text{γραμμομρία \% P(2)} - \text{γραμμομρία \% S(2)})$$

$$\text{γραμμομρία \% O(2)} = \frac{\text{γραμμομρία \% O(1,2,3)}}{\text{γραμμομρία \% UFA}} * (100 - \text{γραμμομρία \% P(2)} - \text{γραμμομρία \% S(2)})$$

$$\text{γραμμομρία \% L(2)} = \frac{\text{γραμμομρία \% L(1,2,3)}}{\text{γραμμομρία \% UFA}} * (100 - \text{γραμμομρία \% P(2)} - \text{γραμμομρία \% S(2)})$$

$$\text{γραμμομρία \% Ln(2)} = \frac{\text{γραμμομρία \% Ln(1,2,3)}}{\text{γραμμομρία \% UFA}} * (100 - \text{γραμμομρία \% P(2)} - \text{γραμμομρία \% S(2)})$$

4.5.5.3. Λιπαρά οξέα στις θέσεις 1 και 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) και Ln(1,3)] (6):

$$\text{γραμμομρία \% P(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% P(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% P(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% P(1,2,3)}$$

$$\text{γραμμομρία \% S(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% S(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% S(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% S(1,2,3)}$$

$$\text{γραμμομρία \% Po(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% Po(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% Po(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% Po(1,2,3)}$$

$$\text{γραμμομρία \% O(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% O(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% O(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% O(1,2,3)}$$

$$\text{γραμμομρία \% L(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% L(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% L(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% L(1,2,3)}$$

$$\text{γραμμομρία \% Ln(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% Ln(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% Ln(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% Ln(1,2,3)}$$

4.5.6. Υπολογισμός των τριακυλογλυκερολίων

4.5.6.1. TAG με ένα μόνο λιπαρό οξύ (AAA, εν προκειμένω LLL, PoPoPo) (7)

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

4.5.6.2. TAG με δύο λιπαρά οξέα (AAB, εν προκειμένω PoPoL, PoLL) (8)

$$\text{γραμμομρία \% AAB} = \frac{\text{γραμμομρία \% A(1,3)} * \text{γραμμομρία \% A(2)} * \text{γραμμομρία \% B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{γραμμομρία \% ABA} = \frac{\text{γραμμομρία \% A(1,3)} * \text{γραμμομρία \% B(2)} * \text{γραμμομρία \% A(1,3)}}{10\ 000}$$

▼ M25

4.5.6.3. TAG με τρία διαφορετικά λιπαρά οξέα (ABC, εν προκειμένω OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

$$\text{γραμμομορία \% ABC} = \frac{\text{γραμμομορία \% A(1,3)} * \text{γραμμομορία \% B(2)} * \text{γραμμομορία \% C(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{γραμμομορία \% BCA} = \frac{\text{γραμμομορία \% B(1,3)} * \text{γραμμομορία \% C(2)} * \text{γραμμομορία \% A(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{γραμμομορία \% CAB} = \frac{\text{γραμμομορία \% C(1,3)} * \text{γραμμομορία \% A(2)} * \text{γραμμομορία \% B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

4.5.6.4. Τριακυλογλυκερόλες με ECN42

Οι τριακυλογλυκερόλες με ECN42 υπολογίζονται από τις εξισώσεις 7, 8 και 9 και στη συνέχεια αναφέρονται κατά τη σειρά της αναμενόμενης έκλουσης στην HPLC (κατά κανόνα, μόνο τρεις κορυφές).

LLL

PoLL και το ισομερές θέσης LPoL

OLLn και τα ισομερή θέσης OLnL και LnOL

PoPoL και το ισομερές θέσης PoLPo

PoOLn και τα ισομερή θέσης OPoLn και OLnPo

PLLn και τα ισομερή θέσης LLnP και LnPL

PoPoPo

SLnLn και το ισομερές θέσης LnSLn

PPoLn και τα ισομερή θέσης PLnPo και PoPLn

Οι τριακυλογλυκερόλες με ECN42 προκύπτουν ως το άθροισμα των εννέα τριακυλογλυκερολών, συμπεριλαμβανομένων των ισομερών θέσης. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να εκφράζονται με δύο τουλάχιστον δεκαδικά ψηφία.

5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η υπολογιζόμενη θεωρητική περιεκτικότητα συγκρίνεται με την περιεκτικότητα που προσδιορίζεται με ανάλυση HPLC. Εάν η διαφορά μεταξύ των απολύτων τιμών των δεδομένων που έχουν προκύψει από την HPLC και των θεωρητικών δεδομένων υπερβαίνει τις τιμές που προβλέπονται στο πρότυπο, για την αντίστοιχη κατηγορία ελαιολάδου, το δείγμα περιέχει σπορέλαιο.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία.

6. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ (ΟΙ ΑΡΙΘΜΟΙ ΠΑΡΑΠΕΜΠΟΥΝ ΣΕ ΕΝΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ)

— 4.5.1. Υπολογισμός των % γραμμομορίων λιπαρών οξέων από δεδομένα χρωματογραφίας αερίου-υγρού (κανονικοποιημένο εμβαδόν %)

Ελήφθησαν τα ακόλουθα δεδομένα για τη σύσταση σε λιπαρά οξέα, με χρωματογραφία υγρού-αερίου

Λιπαρό οξύ	P	S	Po	O	L	Ln
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Εμβαδόν %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

- 4.5.3 *Μετατροπή του εμβαδού % σε γραμμομόρια για όλα τα λιπαρά οξέα [βλέπε τύπο (1)]*

$$\begin{aligned}\text{γραμμομόρια P} &= \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ γραμμομόρια P} \\ \text{γραμμομόρια S} &= \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ γραμμομόρια S} \\ \text{γραμμομόρια Po} &= \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ γραμμομόρια Po} \\ \text{γραμμομόρια O} &= \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ γραμμομόρια O} \\ \text{γραμμομόρια L} &= \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ γραμμομόρια L} \\ \text{γραμμομόρια Ln} &= \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ γραμμομόρια Ln} \\ \text{Σύνολο} &= 0,35821 \text{ γραμμομόρια TAG}\end{aligned}$$

- 4.5.4 *Κανονικοποίηση των γραμμομορίων λιπαρών οξέων στο 100 % [βλέπε τύπο (2)]*

$$\begin{aligned}\text{γραμμομόρια \% P(1,2,3)} &= \frac{0,03900 \text{ γραμμομόρια P} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 10,887 \% \\ \text{γραμμομόρια \% S(1,2,3)} &= \frac{0,01054 \text{ γραμμομόρια S} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 2,942 \% \\ \text{γραμμομόρια \% Po(1,2,3)} &= \frac{0,00393 \text{ γραμμομόρια Po} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 1,097 \% \\ \text{γραμμομόρια \% O(1,2,3)} &= \frac{0,26549 \text{ γραμμομόρια O} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 74,116 \% \\ \text{γραμμομόρια \% L(1,2,3)} &= \frac{0,03566 \text{ γραμμομόρια L} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 9,955 \% \\ \text{γραμμομόρια \% Ln(1,2,3)} &= \frac{0,00359 \text{ γραμμομόρια Ln} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 1,002 \%\end{aligned}$$

$$\text{Σύνολο γραμμομορίων \%} = 100 \%$$

Άθροισμα των κορεσμένων και άθροισμα των ακόρεστων λιπαρών οξέων στις θέσεις 1,2 και 3 των TAG [βλέπε τύπο (3)]

$$\text{γραμμομόρια \% SFA} = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% UFA} = 100,000 \% - 13,829 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

- 4.5.5 *Υπολογισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα στη θέση 2 και στις θέσεις 1 και 3 των TAG*

- 4.5.5.1 *Κορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2 [P(2) and S(2)] [βλέπε τύπο (4)]*

$$\text{γραμμομόρια \% P(2)} = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% S(2)} = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \text{ γραμμομόρια \%}$$

- 4.5.5.2 *Ακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση 2 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) και Ln(1,3)] [βλέπε τύπο (5)]*

$$\text{γραμμομόρια \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% O(2)} = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% L(2)} = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% Ln(2)} = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \text{ γραμμομόρια \%}$$

▼ **M25**

— 4.5.5.3 *Λιπαρά οξέα στις θέσεις 1 και 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) και Ln(1,3)] [βλέπε τύπο (6)]*

$$\text{γραμμομόρια \% P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% L(1,3)} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% Ln(1,3)} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \text{ γραμμομόρια \%}$$

— 4.5.6. *Υπολογισμός των τριακυλογλυκερολών*

Από την υπολογισθείσα σύσταση σε λιπαρά οξέα στις θέσεις στερεοειδικής αρίθμησης 1 και 3

Λιπαρό οξύ	στις θέσεις 1 και 3	στη θέση 2
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Άθροισμα	100,0 %	100,0 %

υπολογίζονται οι ακόλουθες τριακυλογλυκερόλες:

LLL

PoPoPo

PoLL με 1 ισομερές θέσης

SLnLn με 1 ισομερές θέσης

PoPoL με 1 ισομερές θέσης

PPoLn με 2 ισομερή θέσης

OLLn με 2 ισομερή θέσης

PLLn με 2 ισομερή θέσης

PoOLn με 2 ισομερή θέσης

— 4.5.6.1. TAG με ένα μόνο λιπαρό οξύ (LLL, PoPoPo) [βλέπε τύπο (7)]

$$\text{mol \% LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,09706 \text{ mol LLL}}$$

$$\text{mol \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,00013 \text{ mol PoPoPo}}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2 TAG με δύο λιπαρά οξέα (PoLL, SLnLn, PoPoL) [βλέπε τύπο (8)]

$$\text{mol \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,02141$$

$$\text{mol \% LPoL} = \frac{9,204 \% * 1,262 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = 0,01069$$

0,03210 mol PoLL

$$\text{mol \% SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,325 \% * 1,153 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00092$$

$$\text{mol \% LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\ 000} = 0,00002$$

0,00094 mol SLnLn

$$\text{mol \% PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00236$$

$$\text{mol \% PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

— 4.5.6.3 TAG με τρία διαφορετικά λιπαρά οξέα (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) [βλέπε τύπο (9)]

$$\text{mol \% PPoLn} = \frac{16,004 \% * 1,262 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00374$$

$$\text{mol \% LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,00012$$

$$\text{mol \% PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,00375$$

0,00761 mol PPoLn

$$\text{mol \% OLLn} = \frac{68,526 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,14556$$

$$\text{mol \% LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,296 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,14555$$

$$\text{mol \% LLnO} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,14544$$

0,43655 mol OLLn

$$\text{mol \% PLLn} = \frac{16,004 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,03399$$

$$\text{mol \% LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00111$$

$$\text{mol \% LLnP} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,03397$$

0,06907 mol PLLn

▼ **M25**

$$\text{mol \% PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,296 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,01605$$

$$\text{mol \% LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,262 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,01603$$

$$\text{mol \% OLnPo} = \frac{68,526 \% * 1,153 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,01604$$

0,04812 mol PoOLn

ECN42 = 0,69512 mol TAG

Σημείωση 1: Η σειρά έκλουσης μπορεί να προσδιοριστεί με υπολογισμό των ισοδύναμων αριθμών ατόμων άνθρακα, οι οποίοι συχνά ορίζονται από τη σχέση $ECN = CN - 2n$, όπου CN είναι ο αριθμός ατόμων άνθρακα και n ο αριθμός διπλών δεσμών. Η εν λόγω σειρά μπορεί να υπολογιστεί ακριβέστερα αν ληφθεί υπόψη η προέλευση των διπλών δεσμών. Αν n_o , n_i και n_{ln} είναι οι αριθμοί των διπλών δεσμών του ελαϊκού, του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος, αντίστοιχα, ο ισοδύναμος αριθμός ατόμων άνθρακα μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση που παριστά ο ακόλουθος τύπος:

$$EN = CN - d_o n_o - d_i n_i - d_{ln} n_{ln}$$

όπου οι συντελεστές d_o , d_i και d_{ln} υπολογίζονται από τα τριγλυκερίδια αναφοράς. Στις συνθήκες που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο, η σχέση που προκύπτει είναι κατά προσέγγιση:

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

Σημείωση 2: Για αρκετά τριγλυκερίδια αναφοράς είναι επίσης δυνατόν να υπολογιστεί η διαχωριστική ικανότητα ως προς την τριελαΐνη

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

με τη χρήση του ανηγμένου χρόνου κατακράτησης $RT^1 = RT - RT \text{ διαλύτη}$

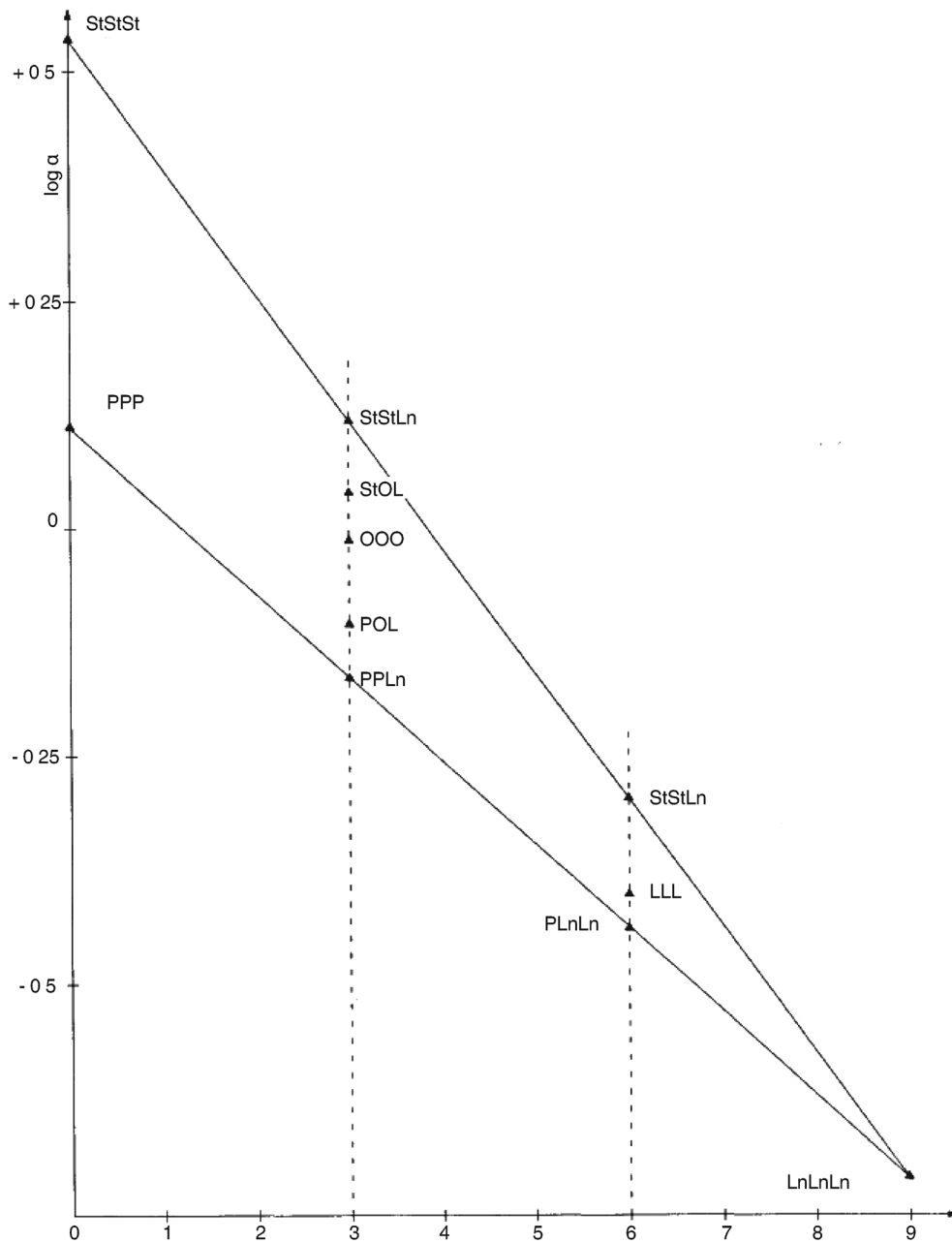
Η γραφική παράσταση του λογάριθμου $\log \alpha$ συναρτήσει του αριθμού των διπλών δεσμών επιτρέπει τον προσδιορισμό των τιμών χρόνου κατακράτησης για όλα τα τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων που περιέχουν τα τριγλυκερίδια αναφοράς – βλέπε σχήμα 1.

Σημείωση 3: Η αποδοτικότητα της στήλης θα πρέπει να επιτρέπει τον πλήρη διαχωρισμό της κορυφής που αντιστοιχεί στην τριλινελαΐνη από τις κορυφές που αντιστοιχούν στα τριγλυκερίδια με γειτονικούς χρόνους κατακράτησης. Η έκλουση εκτελείται μέχρι την κορυφή που αντιστοιχεί στον ECN 52.

Σημείωση 4: Εξασφαλίζεται ορθή μέτρηση του εμβαδού όλων των κορυφών που ενδιαφέρουν στο πλαίσιο του παρόντος προσδιορισμού, αν η δεύτερη κορυφή που αντιστοιχεί στον ECN 50 καλύπτει το 50 % της πλήρους κλίμακας του καταγραφέα.

▼ **M25**

Σχήμα 1

Γραφική παράσταση του λογάριθμου $\log a$ συναρτήσει του αριθμού των διπλών δεσμών

Αριθμός διπλών δεσμών

La: λαυρικό οξύ, My: μυριστικό οξύ, P: παλμιτικό οξύ, S: στεατικό οξύ, O: ελαϊκό οξύ,

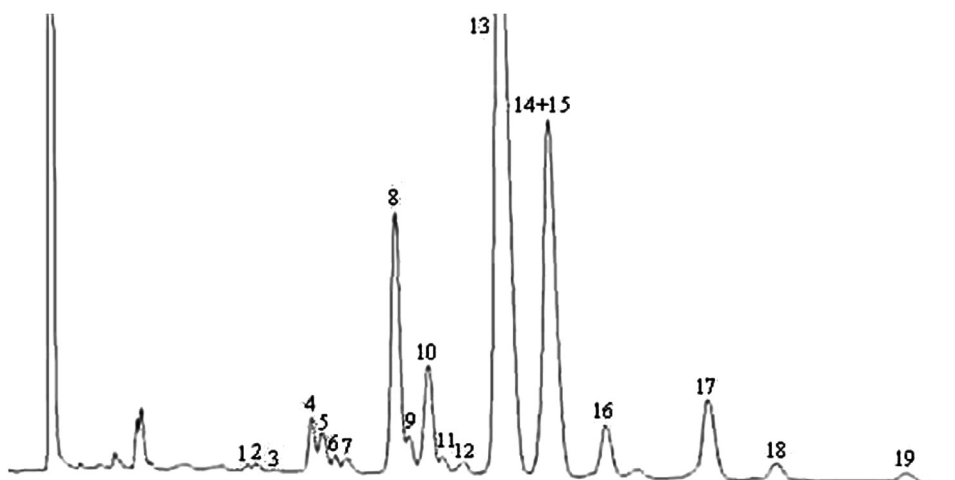
L: λινελαϊκό οξύ, Ln: λινολενικό οξύ

▼ **M25**

Σχήμα 2

Ελαιόλαδο χαμηλής περιεκτικότητας σε λινελαϊκό οξύ

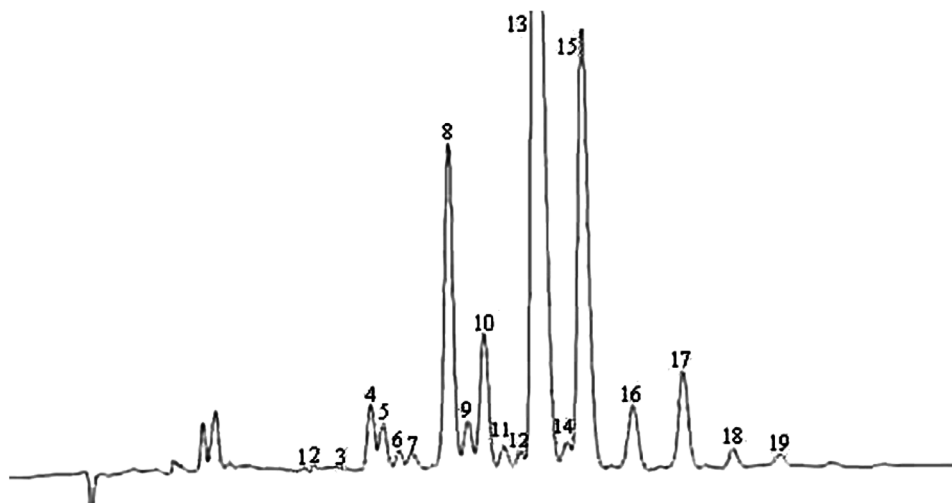
α)



Με διαλύτη: μείγμα ακετόνης-ακετονιτρίλιου

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ α: Κύρια συστατικά των χρωματογραφικών κορυφών: **ECN42:** (1) LLL + PoLL, (2) OLLn + PoOLn, (3) PLLn· **ECN44:** (4) OLL + PoOL, (5) OOLn + PLL, (6) POLn + PPOPo, (7) OOL + PoOO· **ECN46:** (8) OOL + LnPP, (9) PoOO, (10) SLL + PLO, (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo, (12) PLP· **ECN48:** (13) OOO + PoPP, (14 + 15) SOL + POO, (16) POP· **ECN50:** (17) SOO, (18) POS + SLS.

β)



Με διαλύτη: προπιονιτρίλιο

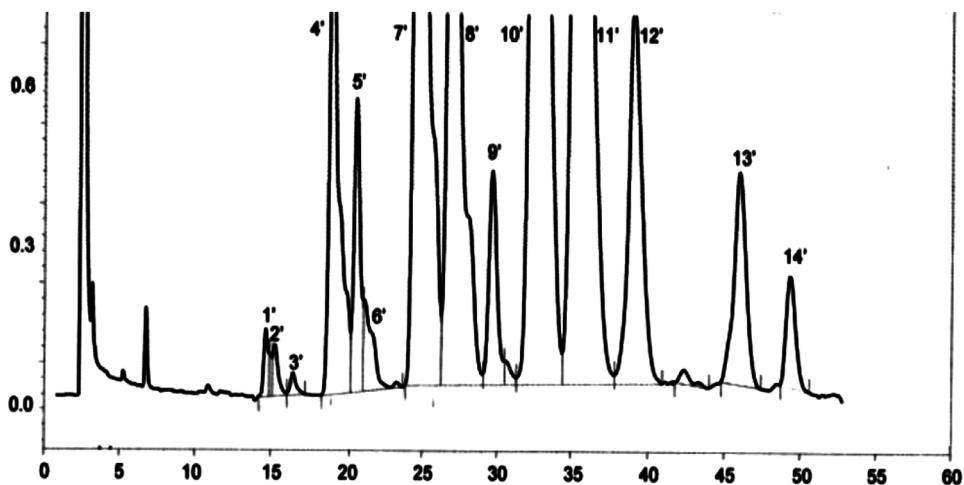
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ β: Κύρια συστατικά των χρωματογραφικών κορυφών: **ECN42:** (1) LLL, (2) OLLn + PoLL, (3) PLLn· **ECN44:** (4) OLL, (5) OOLn + PoOL, (6) PLL + PoPoO, (7) POLn + PPOPo + PPOl· **ECN46:** (8) OOL + LnPP, (9) PoOO, (10) SLL + PLO, (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo, (12) PLP· **ECN48:** (13) OOO + PoPP, (14) SOL, (15) POO, (16) POP· **ECN50:** (17) SOO, (18) POS + SLS.

▼ M25

Σχήμα 3

Ελαιόλαδο υψηλής περιεκτικότητας σε λινελαϊκό οξύ

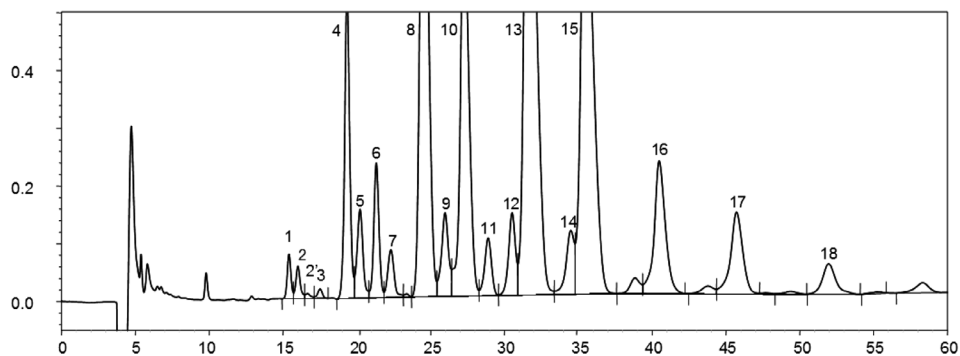
α)



Με διαλύτη: μείγμα ακετόνης-ακετονιτρίλιου (50:50)

Διάγραμμα α: Κύρια συστατικά των χρωματογραφικών κορυφών: **ECN42**: (1') LLL + PoLL, (2') OLLn + PoOLn, (3') PLLn· **ECN44**: (4') OLL + PoOL, (5') OOLn + PLL, (6') POLn + PPoPo· **ECN46**: (7') OOL + PoOO, (8') PLO + SLL + PoOP, (9') PLP + PoPP· **ECN48**: (10') OOO, (11') POO + SLL + PPoO, (12') POP + PLS· **ECN50**: (13') SOO, (14') POS + SLS

β)



Με διαλύτη: προπιονιτρίλιο

Διάγραμμα β: Κύρια συστατικά των χρωματογραφικών κορυφών: **ECN42**: (1) LLL, (2 + 2') OLLn + PoLL, (3) PLLn· **ECN44**: (4) OLL, (5) OOLn + PoOL, (6) PLL + PoPoO, (7) POLn + PPoPo + PPoL· **ECN46**: (8) OOL + LnPP, (9) PoOO, (10) SLL + PLO, (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo· **ECN48**: (12) PLP, (13) OOO + PoPP, (14) SOL, (15) POO, (16) POP· **ECN50**: (17) SOO, (18) POS + SLS· **ECN52**: (19) AOO.

▼ **M19***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIX***ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΑΕΡΙΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΤΡΙΧΟΕΙΔΗ ΣΤΗΛΗ****1. ANTIKEIMENO**

Η μέθοδος περιγράφει διαδικασία προσδιορισμού της περιεκτικότητας λιπαρών υλών σε αλειφατικές αλκοόλες, απλές και ολικές.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η λιπαρή ύλη, μετά από προσθήκη 1-εικοσανόλης ως εσωτερικό πρότυπο, σαπωνοποιείται με αιθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου και στη συνέχεια τα ασαπωνοποιήτα συστατικά εκχυλίζονται με αιθυλαιθέρα. Το κλάσμα των αλκοολών διαχωρίζεται από το εκχύλισμα των ασαπωνοποιήτων με χρωματογραφία σε βασική πλάκα βασικού διοξειδίου του πυριτίου· οι ανακτώμενες από το διοξείδιο του πυριτίου αλκοόλες μετατρέπονται σε τριμεθυλοσιλυλαιθέρες και αναλύονται με χρωματογραφία αέριας φάσης τριχοειδούς στήλης.

3. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- 3.1. Σφαιρική φιάλη 250 ml που φέρει κάθετο ψυκτήρα με εσφυρισμένα άκρα.
- 3.2. Διαχωριστική χοάνη 500 ml.
- 3.3. Σφαιρικές φιάλες 250 ml.
- 3.4. Πλήρης εξοπλισμός για χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με γυάλινες πλάκες 20 × 20 cm.
- 3.5. Λυχνία υπεριώδους, μήκους κύματος 366 ή 254 nm.
- 3.6. Μικροσύριγγες 100 και 500 μl.
- 3.7. Κυλινδρική διηθητική χοάνη με πορώδη ηθμό G3 (πορώδες 15 έως 40 μm) διαμέτρου περίπου 2 cm και ύψους 5 cm, με κατάλληλο άκρο για διήθηση υπό κενό και αρσενικό εσφυρισμένο άκρο 12/21.
- 3.8. Φιάλη κενού των 50 ml με θηλυκό εσφυρισμένο άκρο 12/21 κατάλληλο για τη διηθητική χοάνη (3.7).
- 3.9. Σωλήνας με κωνικό πυθμένα, των 10 ml, με πώμα ασφαλείας.
- 3.10. Χρωματογράφος αέριας φάσης κατάλληλος για λειτουργία με τριχοειδή στήλη, εφοδιασμένος με σύστημα κλασμάτωσης, αποτελούμενος από:
 - 3.10.1. Θερμοστατούμενο θάλαμο για τη στήλη, που επιτρέπει τη διατήρηση της επιθυμητής θερμοκρασίας με ακρίβεια περίπου 1 °C.
 - 3.10.2. Σύστημα έγχυσης με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία και είσοδο από υπερσιλανισμένο γυαλί.
 - 3.10.3. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας και μετατροπέας-ενισχυτής.
- 3.10.4. Καταγραφέας-ολοκληρωτής κατάλληλος για λειτουργία με μετατροπέα-ενισχυτή με χρόνο απόκρισης το πολύ ένα δευτερόλεπτο και με μεταβλητή ταχύτητα χαρτιού.
- 3.11. Τριχοειδής στήλη από γυαλί ή από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, μήκους 20 έως 30 μέτρων, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, καλυμμένη εσωτερικά από υγρό SE-52 ή SE-54 ή ισοδύναμο, με πάχος μεταξύ 0,10 και 0,30 μm.
- 3.12. Μικροσύριγγα για χρωματογραφία αέριας φάσης των 10 μl με εσκληρωμένη βελόνη.
- 3.13. Ζυγός ακριβείας με ευαισθησία 1 mg (με ένδειξη 0,1 mg).

▼ **M19****4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

- 4.1. Υδροξείδιο του καλίου, αιθανολικό διάλυμα περίπου 2 N: 130 g υδροξείδιου του καλίου (ελάχιστου τίτλου 85 %) διαλύονται υπό ψύξη σε 200 ml απεσταγμένου νερού και κατόπιν το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου ενός λίτρου με αιθανόλη. Το διάλυμα φυλάσσεται σε γυάλινες καλά πωματισμένες αδιαφανείς φιάλες.
- 4.2. Αιθυλαιθέρας, αναλυτικής καθαρότητας.
- 4.3. Άνυδρο θειικό νάτριο, αναλυτικής καθαρότητας.
- 4.4. Γυάλινες πλάκες καλυμμένες με διοξείδιο του πυριτίου χωρίς δείκτη φθορισμού, πάχους 0,25 mm (διατίθενται στο εμπόριο έτοιμες για χρήση).
- 4.5. Υδροξείδιο του καλίου, αιθανολικό διάλυμα 0,2 N: 13 g υδροξείδιου του καλίου διαλύονται σε 20 ml απεσταγμένο νερό και το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρις όγκου ενός λίτρου με αιθανόλη.
- 4.6. Βενζόλιο, χρωματογραφικής καθαρότητας (5.2.2).
- 4.7. Ακετόνη, χρωματογραφικής καθαρότητας (5.2.2).
- 4.8. Εξάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας (5.2.2).
- 4.9. Αιθυλαιθέρας, χρωματογραφικής καθαρότητας (5.2.2).
- 4.10. Χλωροφόρμιο, αναλυτικής καθαρότητας.
- 4.11. Διάλυμα αναφοράς για τη χρωματογραφία σε πλάκα: χοληστερόλη ή φυτοστερόλη, διάλυμα 0,5 % σε χλωροφόρμιο.
- 4.12. Διγλωρο-2'-7'-φλουορεσκεΐνη, αιθανολικό διάλυμα 0,2 %. Καθίσταται ελαφρώς βασικό με προσθήκη μερικών σταγονών αλκοολικού διαλύματος υδροξείδιου του καλίου 2 N.
- 4.13. Άνυδρη πυριδίνη, χρωματογραφικής καθαρότητας.
- 4.14. Εξαμεθυλοδισιλαζάνιο.
- 4.15. Τριμεθυλοχλωροσιλάνιο.
- 4.16. Πρότυπα διαλύματα τριμεθυλοσιλυλαιθέρων των αλειφατικών αλκοολών από C₂₀ έως C₂₈. Πρέπει να παρασκευάζονται τη στιγμή της χρήσης από μείγματα καθαρών αλκοολών.
- 4.17. 1-εικοσανόλη, διάλυμα 0,1 % (m/v) σε χλωροφόρμιο (εσωτερικό πρότυπο).
- 4.18. Φέρον αέριο: καθαρό υδρογόνο ή ήλιο, χρωματογραφικής καθαρότητας.
- 4.19. Βοηθητικό αέριο: καθαρό άζωτο, για αέρια χρωματογραφία.

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**5.1. Παρασκευή των ασαπωνοποιήτων**

- 5.1.1. Με τη βοήθεια της μικροσύριγγας 500 μl, εισάγεται στη σφαιρική φιάλη 250 ml διάλυμα 1-εικοσανόλης 0,1 % σε χλωροφόρμιο (4.17) που περιέχει ποσότητα 1-εικοσανόλης που αντιστοιχεί στο 10 % περίπου του περιεχομένου σε αλειφατικές αλκοόλες στην ποσότητα του προς δοκιμή δείγματος. Για παράδειγμα, για 5 g δείγματος, πρέπει να προστίθενται 250 μl του διαλύματος 1-εικοσανόλης 0,1 % εάν πρόκειται για δείγμα ελαιολάδου ή σπορελαίου και 1 500 μl εάν πρόκειται για πυρηνέλαιο.

Ακολουθεί εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηράνσεως και κατόπιν ζυγίζονται 5 g ακριβώς ξηρού δείγματος και προστίθενται υπό διήθηση στην ίδια σφαιρική φιάλη.

▼ **M19**

5.1.2. Προστίθενται 50 ml αιθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου 2 N, τοποθετείται ο κάθετος ψυκτήρας και θερμαίνουμε σε ατμόλουτρο μέχρις ελαφρού βρασμού υπό ταυτόχρονη ζωηρή ανάδευση μέχρις ότου πραγματοποιηθεί σαπωνοποίηση (το διάλυμα γίνεται διανγές). Η θέρμανση συνεχίζεται επί είκοσι λεπτά και κατόπιν προστίθενται 50 ml απεσταγμένο νερό από την κορυφή του ψυκτήρα, ο ψυκτήρας αποσυνδέεται και η σφαιρική φιάλη ψύχεται στους 30 °C περίπου.

5.1.3. Το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης μεταγγίζεται ποσοτικώς σε διαχωριστική χοάνη 500 ml, υποβοηθώντας τη μετάγγιση με την προσθήκη ποσοτήτων απεσταγμένου ύδατος, χρησιμοποιώντας συνολικά 50 ml. Προστίθενται περίπου 80 ml αιθυλαιθέρα, η χοάνη ανακινείται ζωηρά για 30 περίπου δευτερόλεπτα και αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να επέλθει διαχωρισμός (σημείωση 1).

Η υποκείμενη υδατική φάση διαχωρίζεται συλλέγοντάς την σε άλλη διαχωριστική χοάνη. Πραγματοποιούνται ακόμη δύο εκχυλίσες της υδατικής φάσεως, με τον ίδιο τρόπο, χρησιμοποιώντας κάθε φορά 60 έως 70 ml αιθυλαιθέρα.

Σημείωση 1: Τυχόν γαλακτώματα μπορούν να εξαλειφθούν προσθέτοντας με υδροβολέα μικρή ποσότητα αιθυλικής ή μεθυλικής αλκοόλης.

5.1.4. Τα αιθερικά εκχυλίσματα συγκεντρώνονται σε μία μόνη διαχωριστική χοάνη και πλένονται με απεσταγμένο νερό (50 ml κάθε φορά) μέχρις ουδετέρας αντιδράσεως του νερού πλύσεως.

Το νερό πλύσεως απομακρύνεται, το διάλυμα ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο και διηθείται μέσω ανύδρου θειικού νατρίου σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη 250 ml, εκπλένοντας τη χοάνη και το φίλτρο με μικρές ποσότητες αιθυλαιθέρα.

5.1.5. Ο αιθέρας αποστάζεται μέχρις ότου να παραμείνει μόνον μια μικρή ποσότητα και κατόπιν ξηραίνεται υπό ελαφρό κενό ή σε ρεύμα αζώτου, η ξήρανση ολοκληρώνεται σε ξηραντήριο στους 100 °C επί ένα τέταρτο της ώρας περίπου, ακολουθεί ζύγιση και έπειτα ψύξη σε ξηραντήρα.

5.2. Διαχωρισμός του αλκοολικού κλάσματος

5.2.1. Ετοιμασία των βασικών πλακών: οι πλάκες διοξειδίου του πυριτίου (4.4) βυθίζονται πλήρως στο αιθανολικό διάλυμα 0,2 N υδροξειδίου του καλίου (4.5) επί δέκα δευτερόλεπτα και αφήνονται στη συνέχεια να στεγνώσουν καλά σε απαγωγό επί δύο ώρες και τοποθετούνται τελικά σε κλίβανο στους 100 °C επί μία ώρα.

Απομακρύνονται από τον κλίβανο και φυλάσσονται σε ξηραντήρα με γλωριούχο ασβέστιο μέχρι να χρησιμοποιηθούν (οι πλάκες που έχουν προετοιμαστεί με αυτό τον τρόπο πρέπει να χρησιμοποιούνται μέσα σε δεκαπέντε ημέρες).

Σημείωση 2: Η χρήση των βασικών πλακών διοξειδίου του πυριτίου για το διαχωρισμό του αλκοολικού κλάσματος εξαλείφει την ανάγκη κατεργασίας των ασαπωνοποιητών με αλουμίνα. Με τον τρόπο αυτό, όλες οι ενώσεις όξινου χαρακτήρα (λιπαρά οξέα και άλλες) συγκρατούνται στη γραμμή εναπόθεσης. Έτσι, η λωρίδα των αλειφατικών και τερπενικών αλκοολών λαμβάνεται σαφώς διαχωρισμένη από την ταινία των στερολών.

5.2.2. Στο θάλαμο ανάπτυξης εισάγεται μείγμα εξανίου-αιθυλαιθέρα 65/35 (V/V) μέχρις ύψους περίπου 1 cm ⁽¹⁾.

Ο θάλαμος κλείνεται με κατάλληλο καπάκι και αφήνεται έτσι επί μισή ώρα τουλάχιστον έτσι ώστε να αποκατασταθεί ισορροπία υγρού/ατμού. Στις εσωτερικές επιφάνειες του θαλάμου είναι δυνατόν να στερεωθούν λωρίδες διηθητικού χαρτιού που βυθίζονται στο υγρό έκλουσης: με τον τρόπο αυτό μπορεί να μειωθεί κατά το ένα τρίτο περίπου ο χρόνος μετατόπισης του μετώπου του υγρού και να επιτευχθεί πλέον ομοιόμορφη έκλυση των συστατικών.

⁽¹⁾ Σε ιδιαίτερες περιπτώσεις, για να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός των λωρίδων πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως μείγμα έκλουσης βενζόλιο-ακετόνη 95/5 (V/V).

▼ **M19**

Σημείωση 3: Για να έχουμε απολύτως αναπαραγώγιμες συνθήκες έκλουσης, το μείγμα πρέπει να αλλάζει σε κάθε δοκιμή.

- 5.2.3. Παρασκευάζεται διάλυμα 5 % περίπου ασαπωνοποιητών (5.1.5) σε χλωροφόρμιο και, με τη μικροσύριγγα των 100 μl, αποτίθενται στη χρωματογραφική πλάκα (5.2.1) σε απόσταση 2 cm περίπου από το ένα χείλος, 0,3 ml του προαναφερθέντος διαλύματος σε μια συνεχή γραμμή, όσο το δυνατό λεπτότερη και πιο ομοιόμορφη. Στην ευθεία της γραμμής απόθεσης, σε μια από τις άκρες της πλάκας, φέρονται 2 έως 3 μl του διαλύματος αναφοράς των αλειφατικών αλκοολών (4.11), για την ταυτοποίηση της λωρίδας των αλειφατικών αλκοολών κατά την τελευταία ανάπτυξη.

- 5.2.4. Η πλάκα τοποθετείται στο θάλαμο ανάπτυξης, ο οποίος έχει προετοιμαστεί όπως περιγράφεται στο σημείο 5.2.2. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος πρέπει να διατηρείται μεταξύ 15 και 20 °C. Ο θάλαμος κλείνεται αμέσως με το καπάκι και αφήνεται να επέλθει έκλυση μέχρις ότου το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει περίπου 1 cm από το πάνω χείλος της πλάκας.

Η πλάκα στη συνέχεια απομακρύνεται από το θάλαμο ανάπτυξης και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα θερμού αέρα ή καλύτερα αφήνοντας την πλάκα να στεγνώσει σε απαγωγό.

- 5.2.5. Η πλάκα ψεκάζεται ελαφρά και ομοιόμορφα με το διάλυμα της διχλωρο-2'-7'-φλουορεσκεινης. Ως λωρίδα των αλειφατικών αλκοολών αναγνωρίζεται εκείνη που είναι στην ίδια ευθεία με την κηλίδα που λαμβάνεται με το διάλυμα αναφοράς. Με ένα μαύρο μολύβι σημειώνεται το σύνολο της λωρίδας των αλειφατικών αλκοολών και της αμέσως παραπάνω λωρίδας που αντιστοιχεί στις τερπενικές αλκοόλες.

Σημείωση 4: Η υπόδειξη για συλλογή του συνόλου της λωρίδας των αλειφατικών αλκοολών και της λωρίδας των τερπενικών αλκοολών οφείλεται στο ότι σε αυτή, υπό τις συνθήκες της μεθόδου, εγκλωβίζονται σημαντικές ποσότητες αλειφατικών αλκοολών.

- 5.2.6. Με μια μεταλλική σπάτουλα ξύνεται το διοξειδίο του πυριτίου που περιλαμβάνεται στην οριοθετημένη ζώνη. Το ξύσμα εισάγεται στη χοάνη διηθήσεως (3.7), προστίθενται 10 ml θερμού χλωροφορμίου, αναμειγνύουμε επισταμένως με τη μεταλλική σπάτουλα και διηθούμε με τη βοήθεια κενού. Στη συνέχεια το διήθημα συλλέγεται στη φιάλη (3.8), η οποία είναι συνδεδεμένη με τη χοάνη διηθήσεως.

Το υπόλειμμα στη χοάνη πλένεται τρεις φορές με αιθυλαιθέρα (περίπου 10 ml κάθε φορά) και συλλέγεται όπως και το διήθημα στη συνδεδεμένη με τη χοάνη διηθήσεως φιάλη (3.8). Το διήθημα εξατμίζεται μέχρις όγκου περίπου 4 έως 5 ml, το υπολειπόμενο διάλυμα μεταγγίζεται σε προζυγισμένο σωλήνα 10 ml (3.9), ξηραίνεται θερμαίνοντάς το σε ελαφρύ ρεύμα αζώτου, προστίθενται μερικές σταγόνες ακετόνης, ξηραίνεται εκ νέου, τοποθετείται για δέκα λεπτά περίπου στον κλίβανο στους 105 °C, αφήνεται να ψυχθεί σε ξηραντήρα και ζυγίζεται.

Το υπόλειμμα στο σωλήνα αποτελείται από το κλάσμα των αλειφατικών αλκοολών.

5.3. Παρασκευή των τριμεθυλοσιλυλαιθέρων

- 5.3.1. Στο σωλήνα που περιέχει το κλάσμα των αλειφατικών αλκοολών, προστίθεται το αντιδραστήριο σιλυλιώσεως, το οποίο είναι μείγμα πυριδίνης-εξαμεθυλοδισιλαζάνιου-τριμεθυλοχλωροσιλανίου 9/3/1 (V/V/V) (σημείωση 5) σε αναλογία 50 μl ανά χλιοστόγραμμα αλειφατικών αλκοολών, αποφεύγοντας κάθε απορρόφηση υγρασίας (σημείωση 6).

▼ **M19**

Σημείωση 5: Στο εμπόριο υπάρχουν έτοιμα προς χρήση διαλύματα. Υπάρχουν και άλλα σιλυλιωτικά αντιδραστήρια όπως π.χ. το δις-τριμεθυλοσιλυλοτριφθορακεταμίδιο + 1 % τριμεθυλοχλωροσιλάνιο που αραιώνεται με ίσο όγκο άνυδρης πυριδίνης.

Σημείωση 6: Η ενδεχόμενη εμφάνιση μιας ελαφράς θολότητας είναι φυσιολογική και δεν εμπνέει καμία ανησυχία. Ένδειξη παρουσίας υγρασίας ή αλλοίωσης του αντιδραστήριου αποτελεί ο σχηματισμός λευκών νιφάδων ή η εμφάνιση ροζ χρωματισμού. Στην περίπτωση αυτή, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί.

5.3.2. Ο σωλήνας πωματίζεται, ανακινείται προσεκτικά (χωρίς να αναποδογυριστεί) έως την πλήρη διαλυτοποίηση των αλειφατικών αλκοολών. Αφήνεται σε ηρεμία για δεκαπέντε τουλάχιστον λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν φυγοκεντρείται για μερικά λεπτά: το διανυγές διάλυμα είναι έτοιμο για ανάλυση με αεριοχρωματογραφική ανάλυση.

5.4. Ανάλυση με χρωματογραφία αέριας φάσης

5.4.1. Προκαταρκτικές εργασίες, σταθεροποίηση της στήλης

5.4.1.1. Τοποθετείται η στήλη στο χρωματογράφο αέριας φάσης, συνδέοντας το άκρο εισόδου με τον εισαγωγέα που είναι συνδεδεμένος με το σύστημα κλασμάτωσης και το άκρο εξόδου με τον ανιχνευτή. Πραγματοποιούνται οι εν γένει έλεγχοι που απαιτούνται για μια διάταξη χρωματογραφίας αέριας φάσης (στεγανότητα του κυκλώματος των αερίων, αποτελεσματικότητα του ανιχνευτή, αποτελεσματικότητα του συστήματος κλασμάτωσης και του συστήματος καταγραφής κ.λπ.).

5.4.1.2. Εάν η στήλη χρησιμοποιείται για πρώτη φορά, συνιστάται να προηγηθεί σταθεροποίηση. Διοχετεύεται ένα ελαφρό ρεύμα φέροντος αερίου διαμέσου της στήλης αυτής, τίθεται σε λειτουργία ο αέριος χρωματογράφος και αρχίζει μια βαθμιαία θέρμανση μέχρις ότου να φθάσουμε σε μια θερμοκρασία τουλάχιστον 20 °C πάνω από εκείνη της συνθήκης λειτουργίας (σημείωση 7). Η θερμοκρασία αυτή διατηρείται για δύο ώρες τουλάχιστον και κατόπιν η διάταξη φέρεται σε συνθήκες λειτουργίας (ρύθμιση της ροής του αερίου και του διαχωρισμού, άναμμα της φλόγας, σύνδεση με τον ηλεκτρονικό καταγράφεα, ρύθμιση της θερμοκρασίας του θαλάμου για τη στήλη, του ανιχνευτή και του εκκινητήρα κ.λπ.) και καταγράφεται το σήμα με ευαισθησία τουλάχιστον δύο φορές πάνω από εκείνη που προβλέπεται για την εκτέλεση της ανάλυσης. Το ίχνος της λαμβανόμενης γραμμής βάσεως πρέπει να είναι γραμμικό, χωρίς οποιαδήποτε φύσεως κορυφή και δεν πρέπει να παρουσιάζει μετατόπιση. Τυχόν αρνητική ευθύγραμμη μετατόπιση δείχνει ατελή στεγανότητα των συνδέσεων της στήλης, τυχόν θετική μετατόπιση δείχνει ανεπαρκή σταθεροποίηση της στήλης.

Σημείωση 7: Η θερμοκρασία σταθεροποίησης πρέπει να είναι πάντοτε κατώτερη κατά 20 °C τουλάχιστον από τη μέγιστη θερμοκρασία που προβλέπεται για το χρησιμοποιούμενο υγρό κατανομής.

5.4.2. Επιλογή συνθηκών εργασίας

5.4.2.1. Οι ενδεικτικές συνθήκες εργασίας είναι οι ακόλουθες:

- θερμοκρασία της στήλης: ισοθερμική έναρξη οκτώ λεπτών στους 180 °C, κατόπιν πρόγραμμα 5 °C ανά λεπτό μέχρι τους 260 °C και κατόπιν ακόμη δεκαπέντε λεπτά στους 260 °C,
- θερμοκρασία του εξατμιστή: 280 °C,
- θερμοκρασία του ανιχνευτή: 290 °C,
- γραμμική ταχύτητα του φέροντος αερίου: ήλιο, 20 έως 35 cm ανά δευτερόλεπτο, υδρογόνο, 30 έως 50 cm ανά δευτερόλεπτο,
- λόγος της διαίρεσης διαχωρισμού: από 1/50 έως 1/100,
- ευαισθησία οργάνου: τετραπλάσια έως 16πλάσια της ελάχιστης εξασθένησης,

▼ M19

- ευαισθησία καταγραφής: 1 έως 2 millivolts στη βασική κλίμακα,
- ταχύτητα του χαρτιού: 30 έως 60 cm ανά ώρα,
- ποσότητα εγχυόμενης ουσίας: 0,5 έως 1 μl διαλύματος TMSE.

Οι συνθήκες αυτές μπορούν να τροποποιούνται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της στήλης και του χρωματογράφου έτσι ώστε να λαμβάνονται χρωματογραφήματα που να ικανοποιούν τις ακόλουθες συνθήκες:

- ο χρόνος κατακράτησης της αλκοόλης C₂₆ πρέπει να είναι 18 ± πέντε λεπτά,
- η κορυφή της αλκοόλης C₂₂ πρέπει να είναι 80 ± 20 % της βασικής κλίμακας για το ελαιόλαδο και για τα σπορέλαια 40 ± 20 % της βασικής κλίμακας.

5.4.2.2. Για τον έλεγχο των απαιτούμενων ανωτέρω συνθηκών, πραγματοποιούνται επανειλημμένες εγχύσεις με τα δείγματα μειγμάτων των TMSE των αλκοολών και οι λειτουργικές συνθήκες προσαρμόζονται μέχρις ότου ληφθούν τα καλύτερα αποτελέσματα.

5.4.2.3. Οι παράμετροι ολοκλήρωσης των κορυφών πρέπει να τίθενται κατά τρόπον ώστε να λαμβάνονται σωστές τιμές για τις εξεταζόμενες κορυφές.

5.4.3. Εκτέλεση της ανάλυσης

5.4.3.1. Λαμβάνεται με τη μικροσύριγγα των 10 μl, 1 μl εξανίου, αναρροφώνται 0,5 μl αέρα και διαδοχικώς 0,5 έως 1 μl του διαλύματος του δείγματος. Τραβάμε λίγο ακόμη το έμβολο της σύριγγας έτσι ώστε η βελόνα να κενωθεί. Εισάγουμε τη βελόνα στη μεμβράνη της διάταξης εγχύσεως και μετά ένα έως δύο δευτερόλεπτα εγχύουμε ταχύτατα, εξάγοντας στη συνέχεια αργά τη βελόνα, μετά πέντε δευτερόλεπτα περίπου.

5.4.3.2. Εκτελείται καταγραφή μέχρι πλήρους εκλούσεως των TMSE των υπαρχουσών αλειφατικών αλκοολών. Η γραμμή βάσης πρέπει να πληροί πάντοτε τις απαιτούμενες συνθήκες (5.4.1.2).

5.4.4. Ταυτοποίηση των κορυφών

Η ταυτοποίηση των μεμονωμένων κορυφών πραγματοποιείται βάσει των χρόνων κατακράτησης και διά συγκρίσεως με το μείγμα των TMSE των αλειφατικών αλκοολών, με ανάλυση υπό τις ίδιες συνθήκες.

Η εικόνα 1 δείχνει χρωματογράφημα του αλκοολικού κλάσματος ενός παρθένου ελαιολάδου.

5.4.5. Ποσοτικός προσδιορισμός

5.4.5.1. Προβαίνουμε με τον ολοκληρωτή στον υπολογισμό του εμβαδού των κορυφών της 1-εικοσανόλης και των αλειφατικών αλκοολών C₂₂, C₂₄, C₂₆ και C₂₈.

5.4.5.2. Η περιεκτικότητα σε κάθε μεμονωμένη αλειφατική αλκοόλη υπολογίζεται σε χιλιοστόγραμμα για 1 000 γραμμάρια λιπαρής ύλης, ως εξής:

$$\text{Αλκοόλη } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

όπου:

A_x = εμβαδόν της κορυφής της αλκοόλης x

A_s = εμβαδόν της κορυφής της 1-εικοσανόλης

m_s = βάρος προστιθέμενης 1-εικοσανόλης, σε χιλιοστόγραμμα

m = βάρος ληφθέντος δείγματος για τον προσδιορισμό, σε γραμμάρια.

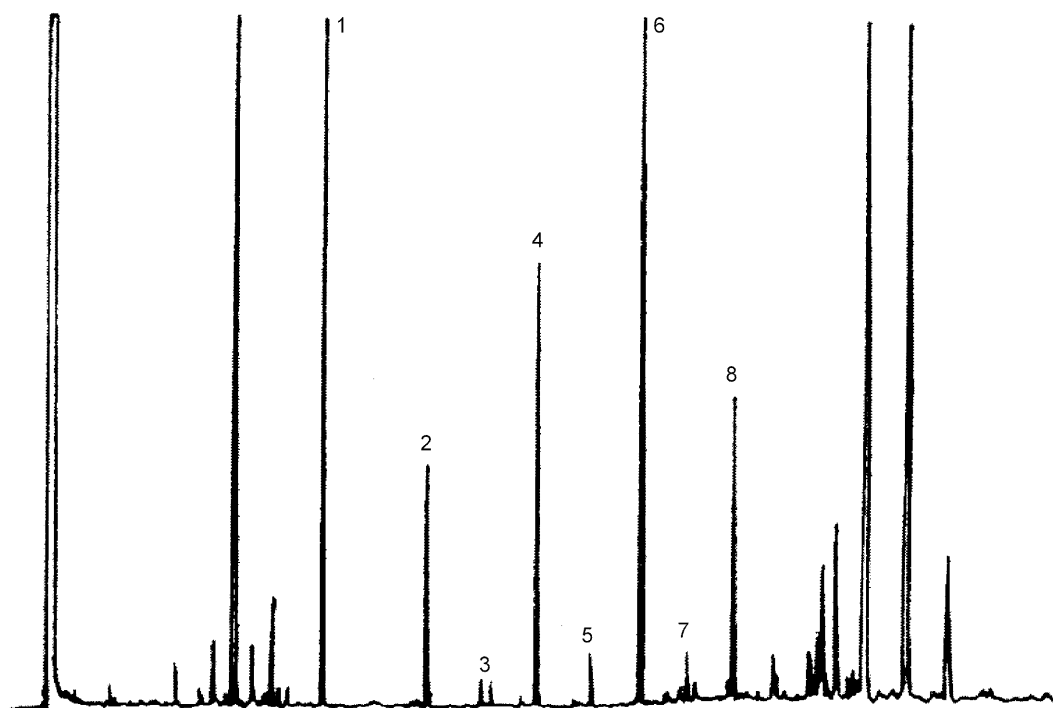
6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι περιεκτικότητες των μεμονωμένων αλειφατικών αλκοολών αναφέρονται σε χιλιοστόγραμμα για 1 000 γραμμάρια λιπαρής ύλης και το άθροισμά τους ως «συνολικές αλειφατικές αλκοόλες».

▼ **M19***ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ**Προσδιορισμός της γραμμικής ταχύτητας του αερίου*

Στο χρωματογράφο αέριας φάσης, ρυθμισμένο σε φυσιολογικές συνθήκες λειτουργίας, εγχύονται 1 έως 3 μl μεθανίου (ή προπανίου) και μετράται ο χρόνος που χρειάζεται το αέριο να διασχίσει τη στήλη, μεταξύ της στιγμής εγχύσεως και εκείνης της εξέδου της κορυφής (tM).

Η γραμμική ταχύτητα σε εκατοστόμετρα ανά δευτερόλεπτο δίδεται από τον τύπο L/tM , όπου L είναι το μήκος της στήλης σε εκατοστόμετρα και tM ο μετρούμενος χρόνος σε δευτερόλεπτα.



Εικόνα 1 — Χρωματογράφημα του αλκοολικού κλάσματος ενός παρθένου ελαιολάδου

- 1 = Εικοσανόλη
- 2 = Εικοσιδυνάνολη
- 3 = Εικοσιτριανόλη
- 4 = Εικοσιτετρανόλη
- 5 = Εικοσιπεντανόλη
- 6 = Εικοσιεξανόλη
- 7 = Εικοσιεπτανόλη
- 8 = Εικοσιοκτανόλη

▼ **M23***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΧΧ*

Μέθοδος προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε κήρους, καθώς και σε μεθυλεστέρες ακι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης

1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των ελαιολάδων σε κηρούς, καθώς και σε μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων. Οι επιμέρους κηροί και αλκυλεστέρες διαχωρίζονται ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα. Η μέθοδος συνιστάται ως μέσο διάκρισης μεταξύ ελαιολάδου και πυρηνελαίου και ως παράμετρος ποιότητας των εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων, βάσει της οποίας είναι δυνατόν να εντοπιστεί η παράνομη ανάμιξη εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων με έλαια κατώτερης ποιότητας, ανεξαρτήτως του εάν αυτά είναι παρθένα ελαιόλαδα, μειονεκτικά ελαιόλαδα (λαμπάντε) ή ορισμένα αποσμημένα έλαια.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προσθήκη κατάλληλων εσωτερικών προτύπων στο έλαιο και κλασματικός διαχωρισμός με χρωματογραφία σε στήλη ένυδρου διοξειδίου του πυριτίου (silica gel). Παραλαβή του κλάσματος που εκλύεται στις συνθήκες της δοκιμής (με πολικότητα μικρότερη εκείνης των τριακυλογλυκερολών) και απευθείας ανάλυση με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

3.1. **Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) των 25 ml**3.2. **Γυάλινη στήλη** για υδροχρωματογραφία, εσωτερικής διαμέτρου 15 mm και μήκους 30-40 cm, εφοδιασμένη με κατάλληλη στρόφιγγα3.3. **Αεριοχρωματογράφος** κατάλληλος για χρήση με τριχοειδή στήλη, εφοδιασμένος με σύστημα απευθείας εισαγωγής του δείγματος στη στήλη (on-column) και αποτελούμενος από:3.3.1. **Θερμοστατούμενο κλίβανο με προγραμματισμό της θερμοκρασίας**3.3.2. **Ψυχρό εγχυτήρα** για την απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη3.3.3. **Ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και μετατροπέα-ενισχυτή**3.3.4. **Καταγραφέα-ολοκληρωτή** (σημείωση 1) για χρήση με τον μετατροπέα-ενισχυτή (σημείο 3.3.3), με χρόνο απόκρισης που δεν υπερβαίνει το 1 δευτερόλεπτο και με μεταβλητή ταχύτητα χαρτιού

Σημείωση 1: Μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται ηλεκτρονικά συστήματα, στα οποία τα αεριοχρωματογραφικά δεδομένα εισάγονται μέσω προσωπικού υπολογιστή.

3.3.5. **Τριχοειδή στήλη από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (για ανάλυση κηρών, μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων)**, μήκους 8 έως 12 μέτρων και εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, επιστρωμένη εσωτερικά με υγρή φάση (σημείωση 2) ομοιόμορφου πάχους 0,10 έως 0,30 μm

Σημείωση 2: Στο εμπόριο κυκλοφορούν κατάλληλες για τον σκοπό αυτό υγρές φάσεις, όπως οι SE 52, SE 54 κ.λπ.

3.4. **Μικροσύριγγα** των 10 μl, με συγκολλημένη στο σώμα της βελόνα, για την απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη3.5. **Ηλεκτρικό τάρακτρο**3.6. **Περιστροφικός εξεταστήρας**3.7. **Θερμομονωμένος κλίβανος**3.8. **Αναλυτικός ζυγός** για ζυγίσεις με ακρίβεια $\pm 0,1$ mg

▼ **M23**

3.9. Συνήθη εργαστηριακά γυάλινα σκεύη

4. **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

4.1. **Διοξείδιο του πυριτίου (silica gel)** κοκκομετρικού βαθμού 60-200 μm. Τοποθετείται το silica gel στον θερμομονωμένο κλίβανο όπου παραμένει σε θερμοκρασία 500 °C επί 4 ώρες τουλάχιστον. Αφήνεται να ψυχθεί και, έπειτα, προστίθεται νερό σε αναλογία 2 % της χρησιμοποιηθείσας ποσότητας silica gel. Το υδαρές μείγμα ανακινείται έντονα ώστε να ομοιογενοποιηθεί και φυλάσσεται στον ξηραντήρα τουλάχιστον επί 12 ώρες πριν χρησιμοποιηθεί.

4.2. **κ-εξάνιο**, χρωματογραφικής καθαρότητας ή καθαρότητας για ανάλυση υπολειμμάτων (η καθαρότητα πρέπει να ελέγχεται)

ΠΡΟΣΟΧΗ – Υπάρχει πιθανότητα ανάφλεξης ατμών. Να διατηρείται μακριά από πηγές θερμότητας, σπινθήρες ή γυμνή φλόγα. Να εξακριβώνεται ότι οι φιάλες είναι πάντα πωματισμένες σωστά. Να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εξαερισμός κατά τη χρήση. Να αποφεύγεται η συγκέντρωση ατμών και να απομακρύνεται κάθε πιθανός κίνδυνος πυρκαγιάς, όπως θερμαντικές ή ηλεκτρικές συσκευές που δεν είναι κατασκευασμένες από άφλεκτο υλικό. Εξαιρετικά επιβλαβές μέσω της εισπνοής, διότι μπορεί να βλάψει τα νευρικά κύτταρα. Να αποφεύγεται η εισπνοή των ατμών. Εάν χρειάζεται, να χρησιμοποιείται κατάλληλη αναπνευστική συσκευή. Να αποφεύγεται η επαφή με τους οφθαλμούς και το δέρμα.

4.3. **Αιθυλαιθέρας, χρωματογραφικής καθαρότητας**

ΠΡΟΣΟΧΗ – Εξαιρετικά εύφλεκτο και μετρίως τοξικό. Ερεθίζει το δέρμα. Εξαιρετικά επιβλαβές μέσω της εισπνοής. Μπορεί να βλάψει τους οφθαλμούς. Οι επιδράσεις ενδέχεται να εμφανιστούν αργότερα. Μπορεί να σχηματίσει εκρηκτικά υπεροξειδία. Υπάρχει πιθανότητα ανάφλεξης ατμών. Να διατηρείται μακριά από πηγές θερμότητας, σπινθήρες ή γυμνή φλόγα. Να εξακριβώνεται ότι οι φιάλες είναι πάντα πωματισμένες σωστά. Να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εξαερισμός κατά τη χρήση. Να αποφεύγεται η συγκέντρωση ατμών και να απομακρύνεται κάθε πιθανός κίνδυνος πυρκαγιάς, όπως θερμαντικές ή ηλεκτρικές συσκευές που δεν είναι κατασκευασμένες από άφλεκτο υλικό. Να μην εξατμίζεται μέχρι ή σχεδόν μέχρι ξηρού. Ο σχηματισμός υπεροξειδίων είναι δυνατόν να περιοριστεί με την προσθήκη νερού ή κατάλληλου αναγωγικού μέσου. Να μην πίνεται. Να αποφεύγεται η εισπνοή των ατμών. Να αποφεύγεται η παρατεταμένη ή επανειλημμένη επαφή με το δέρμα.

4.4. **κ-επτάνιο**, χρωματογραφικής καθαρότητας, ή **ισοοκτάνιο**

ΠΡΟΣΟΧΗ – Εύφλεκτο. Εξαιρετικά επιβλαβές μέσω της εισπνοής. Να διατηρείται μακριά από πηγές θερμότητας, σπινθήρες ή γυμνή φλόγα. Να εξακριβώνεται ότι οι φιάλες είναι πάντα πωματισμένες σωστά. Να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εξαερισμός κατά τη χρήση. Να αποφεύγεται η εισπνοή των ατμών. Να αποφεύγεται η παρατεταμένη ή επανειλημμένη επαφή με το δέρμα.

4.5. **Πρότυπο διάλυμα αραχιδικού λαυρυλίου (σημείωση 3)** σε επτάνιο, συγκέντρωσης 0,05 % (m/V) (εσωτερικό πρότυπο για τους κηρούς)

Σημείωση 3: Μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται παλμιτικό παλμιτύλιο, στεατικό μυριστύλιο ή λαυρικό αραχιδύλιο.

4.6. **Πρότυπο διάλυμα δεκαεπτανικού μεθυλίου σε επτάνιο, συγκέντρωσης 0,02 % (m/V)** (εσωτερικό πρότυπο για τους μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες)

4.7. **Χρωστική Sudan 1 (1-φαινυλαζωναφθόλη-2)**

▼ M23

4.8. **Φέρον αέριο: υδρογόνο ή ήλιο, καθαρό, αεριοχρωματογραφικής καθαρότητας**

ΠΡΟΣΟΧΗ

Υδρογόνο. Εξαιρετικά εύφλεκτο, υπό πίεση. Να διατηρείται μακριά από πηγές θερμότητας, σπινθήρες, γυμνή φλόγα ή ηλεκτρικές συσκευές που δεν είναι κατασκευασμένες από άφλεκτο υλικό. Να εξακριβώνεται ότι όταν η φιάλη δεν χρησιμοποιείται, η βαλβίδα της είναι κλειστή. Να χρησιμοποιείται πάντα με μειωτήρα πίεσης. Να απελευθερώνεται το ελατήριο του μειωτήρα πριν από το άνοιγμα της βαλβίδας της φιάλης. Να μη στέκεται κανείς μπροστά από το στόμιο εξόδου της φιάλης όταν ανοίγεται η βαλβίδα. Να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εξαερισμός κατά τη χρήση. Να μη μεταφέρεται υδρογόνο από μία φιάλη σε άλλη ούτε να αναμιγνύονται αέρια στη φιάλη. Να εξασφαλίζεται ότι αποκλείεται το ενδεχόμενο ανατροπής των φιαλών. Να διατηρούνται οι φιάλες μακριά από το ηλιακό φως και από πηγές θερμότητας. Να αποθηκεύονται σε περιβάλλον χωρίς διαβρωτικούς παράγοντες. Να μη χρησιμοποιούνται φιάλες που έχουν υποστεί φθορές ή δεν φέρουν επισήμανση.

Ήλιο. Συμπιεσμένο αέριο υπό υψηλή πίεση. Μειώνει τη διαθέσιμη για την αναπνοή ποσότητα οξυγόνου. Να διατηρείται η φιάλη κλειστή. Να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εξαερισμός κατά τη χρήση. Να μην εισέρχονται άτομα στους χώρους αποθήκευσης εάν δεν εξασφαλίζεται κατάλληλος εξαερισμός. Να χρησιμοποιείται πάντα με μειωτήρα πίεσης. Να απελευθερώνεται το ελατήριο του μειωτήρα πριν από το άνοιγμα της βαλβίδας της φιάλης. Να μη μεταφέρεται αέριο από μία φιάλη σε άλλη. Να εξασφαλίζεται ότι αποκλείεται το ενδεχόμενο ανατροπής των φιαλών. Να μη στέκεται κανείς μπροστά από το στόμιο εξόδου της φιάλης όταν ανοίγεται η βαλβίδα. Να διατηρούνται οι φιάλες μακριά από το ηλιακό φως και από πηγές θερμότητας. Να αποθηκεύονται σε περιβάλλον χωρίς διαβρωτικούς παράγοντες. Να μη χρησιμοποιούνται φιάλες που έχουν υποστεί φθορές ή δεν φέρουν επισήμανση. Να μην εισπνέεται. Να χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τεχνικούς σκοπούς.

4.9. **Βοηθητικά αέρια:**

— υδρογόνο, καθαρό, αεριοχρωματογραφικής καθαρότητας

— αέρας, καθαρός, αεριοχρωματογραφικής καθαρότητας

ΠΡΟΣΟΧΗ

Αέρας. Συμπιεσμένο αέριο υπό υψηλή πίεση. Να χρησιμοποιείται με προσοχή παρουσία εύφλεκτων ουσιών, καθώς η θερμοκρασία αυτανάφλεξης των περισσότερων από τις οργανικές ενώσεις που περιέχει ο αέρας μειώνεται σημαντικά σε συνθήκες υψηλής πίεσης. Να εξακριβώνεται ότι όταν η φιάλη δεν χρησιμοποιείται, η βαλβίδα της είναι κλειστή. Να χρησιμοποιείται πάντα μειωτήρα πίεσης. Να απελευθερώνεται το ελατήριο του μειωτήρα πριν από το άνοιγμα της βαλβίδας της φιάλης. Να μη στέκεται κανείς μπροστά από το στόμιο εξόδου της φιάλης όταν ανοίγεται η βαλβίδα. Να μη μεταφέρεται αέριο από μία φιάλη σε άλλη, ούτε να αναμιγνύονται αέρια στη φιάλη. Να εξασφαλίζεται ότι αποκλείεται το ενδεχόμενο ανατροπής των φιαλών. Να διατηρούνται οι φιάλες μακριά από το ηλιακό φως και από πηγές θερμότητας. Να αποθηκεύονται σε περιβάλλον χωρίς διαβρωτικούς παράγοντες. Να μη χρησιμοποιούνται φιάλες που έχουν υποστεί φθορές ή δεν φέρουν επισήμανση. Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε συσκευές εισπνοής ή αναπνευστικές αέρας που προορίζεται για τεχνικούς σκοπούς.

5. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

5.1. **Ετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης**

Σχηματίζεται εναιώρημα 15 g silica gel (σημείο 4.1) σε κ-εξάνιο (σημείο 4.2), εισάγεται στη στήλη (σημείο 3.2) και αφήνεται προς αυθόρμητη καθίζηση. Η καθίζηση συμπληρώνεται με τη βοήθεια ηλεκτρικού ταράκτρου, ώστε η χρωματογραφική κλίνη να γίνει πιο ομοιογενής. Διηθούνται μέσω της στήλης 30 ml κ-εξανίου για να απομακρυνθούν οι ενδεχόμενες ξένες προσμείξεις. Ζυγίζονται με ακρίβεια στον αναλυτικό ζυγό (σημείο 3.8) περίπου 500 mg δείγματος μέσα στη φιάλη των 25 ml (σημείο 3.1) και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα εσωτερικού προτύπου (σημείο 4.5), ανάλογα με την εκτιμώμενη περιεκτικότητα σε κηρούς. Για παράδειγμα, προστίθεται 0,1 mg αρχιδικού λαυρυλίου στην περίπτωση του ελαιολάδου, 0,25-0,50 mg στην περίπτωση του πυρηνελαίου και 0,05 mg δεκαεπτανικού μεθυλίου (σημείο 4.6) προκειμένου για ελαιόλαδο.

▼ M23

Το παρασκευαζόμενο με τον τρόπο αυτό δείγμα μεταφέρεται στη χρωματογραφική στήλη με τη βοήθεια δύο ποσοτήτων κ-εξανίου των 2 ml (σημείο 4.2).

Αφήνεται ο διαλύτης να εκρεύσει μέχρι ύψους 1 mm πάνω από την ανώτερη στάθμη του προσροφητικού υλικού. Διηθείται μέσω της στήλης μείγμα κ-εξανίου/αιθυλαιθέρα (99:1) και συλλέγονται 220 ml με ταχύτητα ροής 15 σταγόνων περίπου ανά 10 δευτερόλεπτα. **(Το κλάσμα αυτό περιέχει τους μεθυλεστέρες, τους αιθυλεστέρες και τους κηρούς.)** (Σημείωση 4) (Σημείωση 5)

Σημείωση 4: Το μείγμα κ-εξανίου/αιθυλαιθέρα (99:1) πρέπει να είναι πρόσφατο και να παρασκευάζεται καθημερινά.

Σημείωση 5: Για τον οπτικό έλεγχο της ορθής έκλουσης των κηρών, είναι δυνατόν να προστεθούν στο διάλυμα του δείγματος 100 μl διαλύματος χρωστικής Sudan I στο μείγμα έκλουσης σε αναλογία 1 %.

Η τιμή του χρόνου κατακράτησης της χρωστικής αυτής περικλείεται μεταξύ των αντίστοιχων τιμών των κηρών και των τριακυλογλυκερολών. Συνεπώς, όταν το χρώμα φθάσει στον πυθμένα της χρωματογραφικής στήλης, η έκλουση πρέπει να διακοπεί, καθώς έχουν εκλουσθεί όλοι οι κηροί.

Τα λαμβανόμενα με τον τρόπο αυτό κλάσματα εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι να απομακρυνθεί σχεδόν τελείως ο διαλύτης. Τα εναπομένοντα 2 ml διαλύτη απομακρύνονται με διαβίβαση ασθενούς ρεύματος αζώτου. Το κλάσμα που περιέχει τους μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες συλλέγεται με 2-4 ml κ-επτανίου ή ισοοκτανίου.

5.2. Αεριοχρωματογραφική ανάλυση

5.2.1. Προκαταρκτικές εργασίες

Τοποθετείται η στήλη στον αεριοχρωματογράφο (σημείο 3.3) και συνδέεται το άκρο εισόδου με το σύστημα απευθείας εισαγωγής του δείγματος και το άκρο εξόδου με τον ανιχνευτή. Ελέγχεται το όργανο αεριοχρωματογραφίας (λειτουργία των βρόχων των αερίων, απόδοση του συστήματος ανιχνευτή και καταγραφέα κ.λπ.).

Εάν η στήλη χρησιμοποιείται για πρώτη φορά, συνιστάται η ρύθμιση των συνθηκών της. Διαβιβάζεται ασθενές ρεύμα αερίου μέσω της στήλης και έπειτα τίθεται σε λειτουργία το όργανο. Αυξάνεται σταδιακά η θερμοκρασία μέχρι να φθάσει, μετά από 4 ώρες περίπου, τους 350 °C.

Η θερμοκρασία αυτή διατηρείται επί 2 τουλάχιστον ώρες και ύστερα ρυθμίζεται το όργανο στις συνθήκες λειτουργίας (ρύθμιση της ροής των αερίων, αφή της φλόγας, σύνδεση με τον ηλεκτρονικό καταγραφέα (σημείο 3.3.4), ρύθμιση της θερμοκρασίας του κλιβάνου για τη στήλη και του ανιχνευτή κ.λπ.). Καταγράφεται το σήμα με ευαισθησία τουλάχιστον διπλάσια της απαιτούμενης για την ανάλυση. Η γραμμή βάσης (baseline) πρέπει να είναι ευθεία, χωρίς καμία κορυφή, και να μην παρουσιάζει απόκλιση (ολίσθηση).

Ευθύγραμμη αρνητική απόκλιση υποδηλώνει εσφαλμένες συνδέσεις της στήλης, ενώ θετική απόκλιση υποδηλώνει ακατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών της στήλης.

5.2.2. Επιλογή των συνθηκών λειτουργίας για κηρούς και για μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες (σημείωση 6)

Κατά κανόνα, εφαρμόζονται οι ακόλουθες συνθήκες εργασίας:

— θερμοκρασία της στήλης:

20 °C/min 5 °C/min

80 °C κατά την έναρξη (1') ————— 140 °C —————
335 °C (20)

— θερμοκρασία του ανιχνευτή: 350 °C,

— εγχέομενη ποσότητα: 1 μl του κ-επτανικού διαλύματος (2-4 ml),

▼ **M23**

- φέρον αέριο: ήλιο ή υδρογόνο με τη βέλτιστη γραμμική ταχύτητα για το επιλεγμένο αέριο (βλ. προσάρτημα Α),
- ευαισθησία των οργάνων: κατάλληλη ώστε να πληρούνται οι ανωτέρω όροι.

Σημείωση 6: Λόγω της υψηλής τελικής θερμοκρασίας, γίνεται δεκτή θετική απόκλιση, η οποία όμως δεν μπορεί να υπερβαίνει το 10 % της τιμής της πλήρους κλίμακας.

Οι συνθήκες αυτές μπορούν να τροποποιούνται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της στήλης και του αεριοχρωματογράφου, ώστε να επιτυγχάνονται διαχωρισμός όλων των κηρών και των μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων λιπαρών οξέων, ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα (βλέπε σχήματα 2, 3 και 4) και χρόνος κατακράτησης 18 ± 3 λεπτών για το εσωτερικό πρότυπο αραχιδικό λαυρύλιο. Η αντιπροσωπευτικότερη κορυφή των κηρών πρέπει να υπερβαίνει το 60 % της τιμής της πλήρους κλίμακας, ενώ η κορυφή του δεκαεπτανικού μεθυλίου, εσωτερικού προτύπου για τους μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες, πρέπει να φθάνει την τιμή της πλήρους κλίμακας.

Οι παράμετροι ολοκλήρωσης των κορυφών πρέπει να καθορίζονται κατά τρόπο ώστε να υπολογίζονται σωστά τα εμβαδά των κορυφών που λαμβάνονται υπόψη.

5.3. Εκτέλεση της ανάλυσης

Λαμβάνονται 10 μl διαλύματος με τη μικροσύριγγα των 10 μl και αποσύρεται το έμβολο της σύριγγας ώστε να εκκενωθεί η βελόνα. Εισάγεται η βελόνα στο σύστημα έγχυσης και μετά από 1 έως 2 δευτερόλεπτα εγχέεται το διάλυμα γρήγορα. Μετά από 5 δευτερόλεπτα περίπου, η βελόνα εξάγεται αργά.

Καταγράφονται οι ενδείξεις του οργάνου μέχρι την πλήρη έκλυση των κηρών ή των στιγμασταδιενίων, ανάλογα με το κλάσμα που υποβάλλεται σε ανάλυση.

Η γραμμή βάσης πρέπει πάντοτε να ανταποκρίνεται στους απαιτούμενους όρους.

5.4. Ταυτοποίηση των κορυφών

Ταυτοποιούνται οι διάφορες κορυφές βάσει των χρόνων κατακράτησης, με σύγκριση με μείγματα κηρών γνωστών χρόνων κατακράτησης τα οποία υποβλήθηκαν σε ανάλυση στις ίδιες συνθήκες. Οι αλκυλεστέρες ταυτοποιούνται με τη βοήθεια μειγμάτων μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων των κυριότερων λιπαρών οξέων του ελαιολάδου (παλμιτικό και ελαϊκό οξύ).

Στο σχήμα 1 εμφανίζεται χρωματογράφημα των κηρών παρθένου ελαιολάδου. Στα σχήματα 2 και 3 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα δύο εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων του λιανικού εμπορίου, από τα οποία το ένα περιέχει μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες και το άλλο όχι. Στο σχήμα 4 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα ενός εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου κορυφαίας ποιότητας και του ίδιου ελαιολάδου μετά από επιβάρυνση με 20 % αποσμημένου ελαίου.

5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός των κηρών

Υπολογίζονται με τη βοήθεια του ολοκληρωτή τα εμβαδά των κορυφών που αντιστοιχούν στο εσωτερικό πρότυπο αραχιδικό λαυρύλιο και στους αλειφατικούς εστέρες με αριθμό ατόμων άνθρακα C_{40} έως C_{46} .

Υπολογίζεται η συνολική περιεκτικότητα σε κηρούς, σε mg/kg λίπους, με πρόσθεση των επιμέρους κηρών ως εξής:

$$\text{Κηροί, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ **M23**

όπου:

A_x = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί σε κάθε εστέρα, σε μονάδες υπολογιστή,

A_s = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο αραχιδικό λαυρύλιο, σε μονάδες υπολογιστή,

m_s = η προστιθέμενη μάζα αραχιδικού λαυρυλίου ως εσωτερικού προτύπου, σε χιλιοστόγραμμα,

m = η μάζα του λαμβανόμενου για τον προσδιορισμό δείγματος, σε γραμμάρια.

5.5.1. Ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων

Υπολογίζονται με τη βοήθεια του ολοκληρωτή τα εμβαδά των κορυφών που αντιστοιχούν στο εσωτερικό πρότυπο δεκαεπτανικό μεθύλιο, στους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων με αριθμό ατόμων άνθρακα C_{16} και C_{18} και στους αιθυλεστέρες των οξέων αυτών.

Υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε καθέναν από τους αλκυλεστέρες, σε mg/kg λίπους, ως εξής:

$$\text{Εστέρας, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

όπου:

A_x = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί σε κάθε εστέρα C_{16} και C_{18} , σε μονάδες υπολογιστή,

A_s = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο δεκαεπτανικό μεθύλιο, σε μονάδες υπολογιστή,

m_s = η προστιθέμενη μάζα δεκαεπτανικού μεθυλίου ως εσωτερικού προτύπου, σε χιλιοστόγραμμα,

m = η μάζα του λαμβανόμενου για τον προσδιορισμό δείγματος, σε γραμμάρια.

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αναφέρεται η συνολική περιεκτικότητα στους διάφορους κηρούς C_{40} έως C_{46} (σημείωση 7), σε mg/kg λίπους.

Αναφέρεται η συνολική περιεκτικότητα σε μεθυλεστέρες C_{16} έως C_{18} και αιθυλεστέρες C_{16} έως C_{18} και το άθροισμα των δύο.

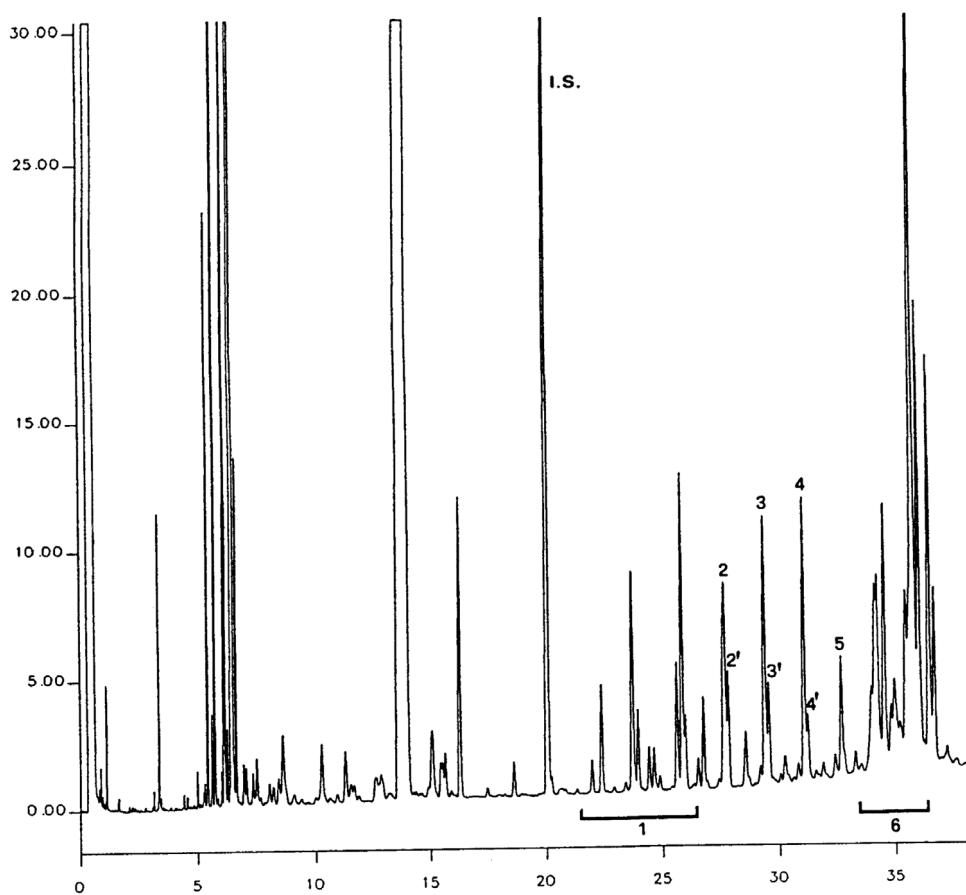
Τα αποτελέσματα θα πρέπει να εκφράζονται στο πλησιέστερο mg/kg.

Σημείωση 7: Τα συστατικά που προσδιορίζονται ποσοτικά αναφέρονται στις κορυφές που αντιστοιχούν σε εστέρες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα μεταξύ C_{40} και C_{46} , κατά το παράδειγμα του χρωματογραφήματος κηρών ελαιολάδου που παρατίθεται στο κατωτέρω σχήμα. Για την ταυτοποίηση, σε περίπτωση διαίρεσης της κορυφής του εστέρα C_{46} , συνιστάται η ανάλυση του κλάσματος κηρών πυρινηλαίου, όπου η κορυφή C_{46} είναι διακριτή επειδή υπερισχύει εμφανώς.

Αναφέρεται η αναλογία μεταξύ των αιθυλεστέρων και των μεθυλεστέρων.

▼ M23

Σχήμα 1

Παράδειγμα χρωματογράφηματος του κλάσματος κηρών ελαιολάδου ⁽¹⁾

Κορυφές των μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων λιπαρών οξέων με χρόνο κατακράτησης 5 έως 8 λεπτών

Υπόμνημα:

I.S. = Αραχιδικό λαυρύλιο

1 = Διτερπενικοί εστέρες

2+2' = Εστέρες C₄₀

3+3' = Εστέρες C₄₂

4+4' = Εστέρες C₄₄

5 = Εστέρες C₄₆

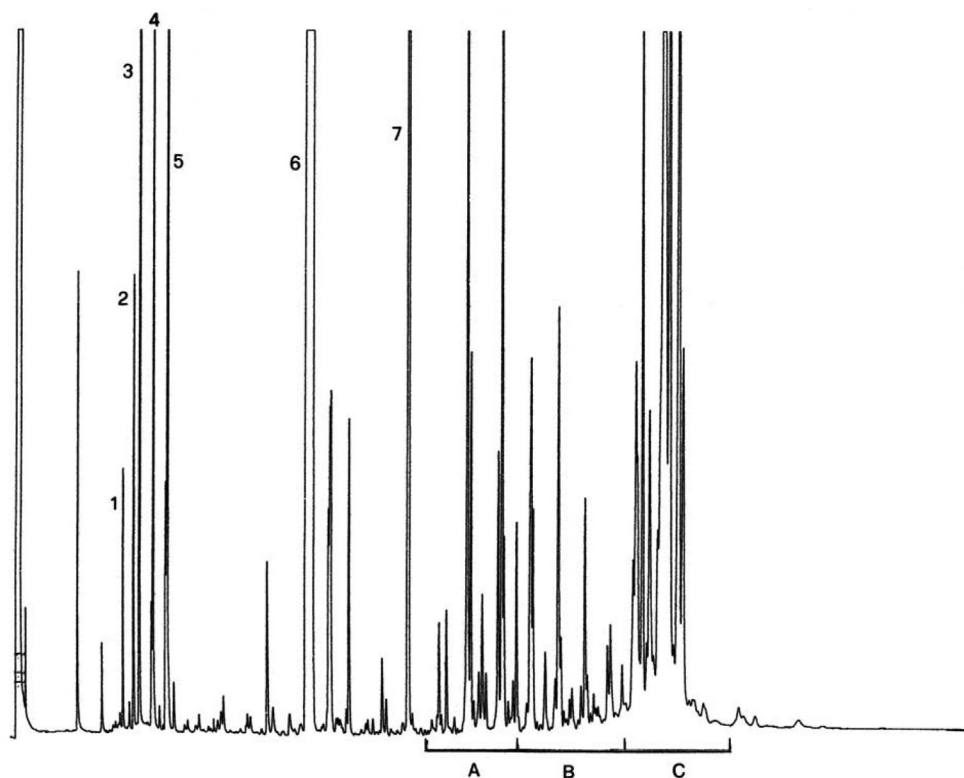
6 = Εστέρες στερολών και τριτερπενικές αλκοόλες

⁽¹⁾ Μετά την έκλουση των εστέρων των στερολών, το χρωματογράφημα δεν πρέπει να παρουσιάζει σημαντικές κορυφές (τριακυλογλυκερόλες).

▼ **M23**

Σχήμα 2

Μεθυλεστέρες, αιθυλεστέρες και κηροί παρθένου ελαιολάδου



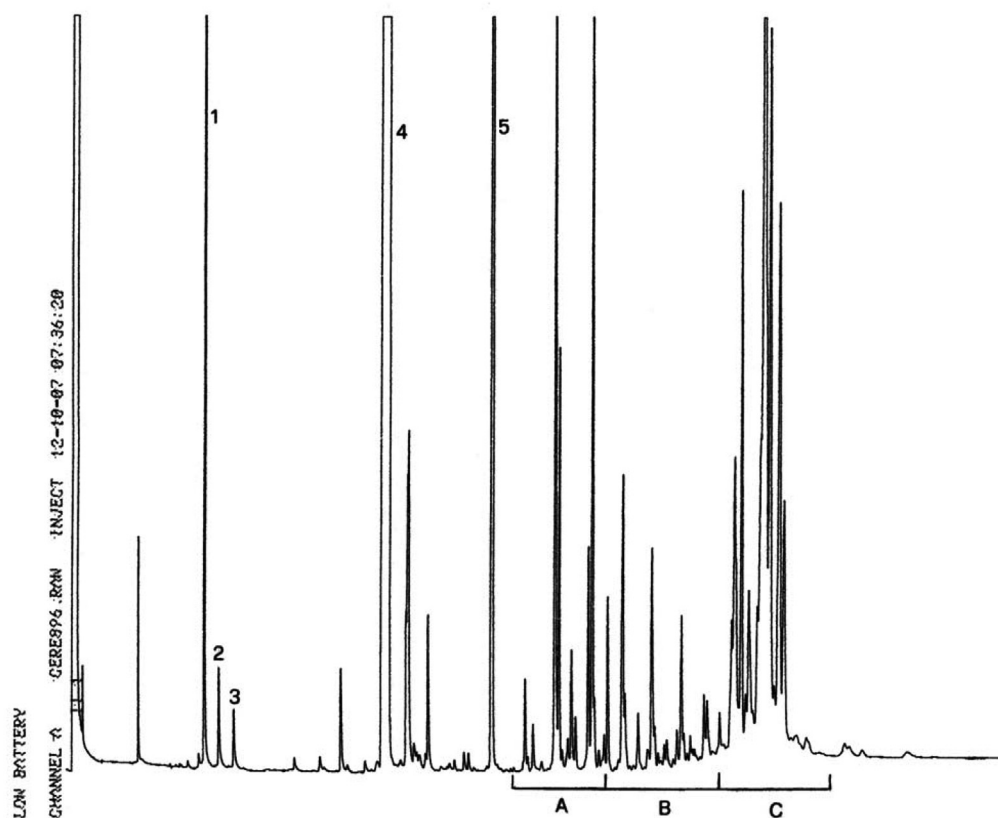
Υπόμνημα:

- 1 – Μεθυλεστέρας C_{16}
- 2 – Αιθυλεστέρας C_{16}
- 3 – Δεκαεπτανικό μεθύλιο (εσωτ. πρότυπο)
- 4 – Μεθυλεστέρας C_{18}
- 5 – Αιθυλεστέρας C_{18}
- 6 – Σκουαλένιο
- 7 – Αραχιδικό λαυρύλιο (εσωτ. πρότυπο)
- A – Διτερπενικοί εστέρες
- B – Κηροί
- C – Εστέρες στερολών και τριτερπενίων

▼ **M23**

Σχήμα 3

Μεθυλεστέρες, αιθυλεστέρες και κηροί εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου



Υπόμνημα:

1 – Δεκαεπτανικό μεθύλιο (εσωτ. πρότυπο)

2 – Μεθυλεστέρας C₁₈3 – Αιθυλεστέρας C₁₈

4 – Σκουαλένιο

5 – Αραχιδικό λαυρύλιο (εσωτ. πρότυπο)

A – Διτερπενικοί εστέρες

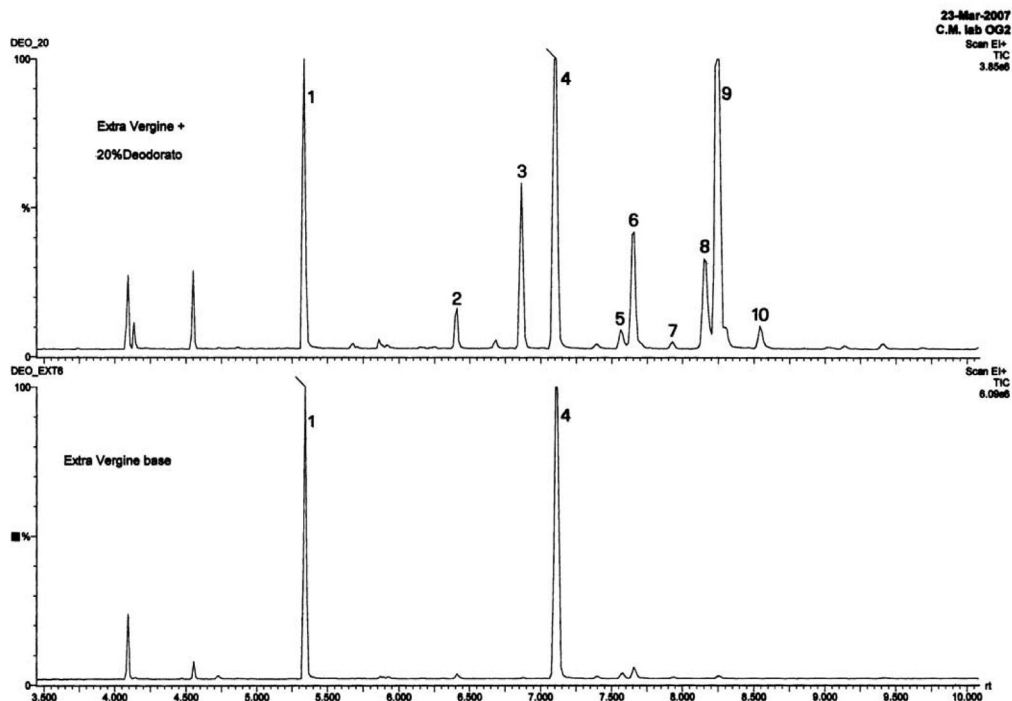
B – Κηροί

C – Εστέρες στερολών και τριτερπενίων

▼ M23

Σχήμα 4

Τμήμα χρωματογραφήματος ενός εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου και του ίδιου ελαιολάδου μετά από επιβάρυνση με αποσμημένο έλαιο



Υπόμνημα:

- 1 – Μυριστικό μεθύλιο (εσωτ. πρότυπο)
- 2 – Παλμιτικό μεθύλιο
- 3 – Παλμιτικό αιθύλιο
- 4 – Δεκαεπτανικό μεθύλιο (εσωτ. πρότυπο)
- 5 – Λινελαϊκό μεθύλιο
- 6 – Ελαϊκό μεθύλιο
- 7 – Στεατικό μεθύλιο
- 8 – Λινελαϊκό αιθύλιο
- 9 – Ελαϊκό αιθύλιο
- 10 – Στεατικό αιθύλιο

▼ M23*Προσάρτημα Α***Προσδιορισμός της γραμμικής ταχύτητας αερίου**

Εγχέονται 1 έως 3 μl μεθανίου (ή προπανίου) στον αεριοχρωματογράφο, ο οποίος έχει προηγουμένως ρυθμίζεται στις κανονικές συνθήκες λειτουργίας. Χρονομετρείται η διαδρομή του αερίου μέσω της στήλης από την έγχυσή του μέχρι την εμφάνιση της κορυφής (tM).

Η γραμμική ταχύτητα, σε cm/s, δίδεται από τη σχέση L/tM , όπου L το μήκος της στήλης, σε εκατοστόμετρα, και tM ο χρόνος, σε δευτερόλεπτα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XXI

Αποτελέσματα των αναφερόμενων στο άρθρο 8 παράγραφος 2 ελέγχων συμμόρφωσης για τα ελαιόλαδα

				Επισήμανση						Χημικές παράμετροι			Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ⁽⁴⁾			Τελικό πόρισμα	
Δείγμα	Κατηγορία	Χώρα καταγωγής	Τόπος ελέγχου ⁽¹⁾	Επωνυμία	Ονομασία προέλευσης	Συνθήκες αποθήκευσης	Ανακριβείς πληροφορίες	Ευανάγνωστη	C/NC ⁽³⁾	Παράμετροι εκτός ορίων Ναι/Όχι	Εάν ναι, προσδιορίζονται αυτές οι παράμετροι ⁽²⁾	C/NC ⁽³⁾	Διάμεσος-ελαττωμάτων	Διάμεσος-φρουτώδους	C/NC ⁽³⁾	Απαιτούμενη ενέργεια	Κύρωση

⁽¹⁾ εσωτερική αγορά (ελαιοτριβεία, εμφιαλωτές, έμποροι λιανικής), εξαγωγές, εισαγωγές
⁽²⁾ Κάθε χαρακτηριστικό του ελαιολάδου κατά το παράρτημα I φέρει κωδικό.
⁽³⁾ Συμμόρφωση/Μη συμμόρφωση
⁽⁴⁾ Δεν απαιτείται για το ελαιόλαδο και το πυρηνέλαιο.