

Το έγγραφο αυτό συνιστά βοήθημα τεκμηρίωσης και δεν δεσμεύει τα κοινοτικά όργανα

► **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
► M1 Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 3682/91 της Επιτροπής της 17ης Δεκεμβρίου 1991	L 349	36	18.12.1991
► M2 Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1429/92 της Επιτροπής της 26ης Μαΐου 1992	L 150	17	2.6.1992
► M3 Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1683/92 της Επιτροπής της 29ης Ιουνίου 1992	L 176	27	30.6.1992
► M4 Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 1996/92 της Επιτροπής της 15ης Ιουλίου 1992	L 199	18	18.7.1992
► M5 Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 3288/92 της Επιτροπής της 12ης Νοεμβρίου 1992	L 327	28	13.11.1992
► M6 Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 183/93 της Επιτροπής της 29ης Ιανουαρίου 1993	L 22	58	30.1.1993
► M7 όπως τροποποιήθηκε από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 826/93 της Επιτροπής της 6ης Απριλίου 1993	L 87	6	7.4.1993
► M8 Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 620/93 της Επιτροπής της 17ης Μαρτίου 1993	L 66	29	18.3.1993
► M9 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 177/94 της Επιτροπής της 28ης Ιανουαρίου 1994	L 24	33	29.1.1994
► M10 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2632/94 της Επιτροπής της 28ης Οκτωβρίου 1994	L 280	43	29.10.1994
► M11 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 656/95 της Επιτροπής της 28ης Μαρτίου 1995	L 69	1	29.3.1995
► M12 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2527/95 της Επιτροπής της 27ης Οκτωβρίου 1995	L 258	49	28.10.1995
► M13 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2472/97 της Επιτροπής της 11ης Δεκεμβρίου 1997	L 341	25	12.12.1997
► M14 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 282/98 της Επιτροπής της 3ης Φεβρουαρίου 1998	L 28	5	4.2.1998
► M15 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2248/98 της Επιτροπής της 19ης Οκτωβρίου 1998	L 282	55	20.10.1998
► M16 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 379/1999 της Επιτροπής της 19ης Φεβρουαρίου 1999	L 46	15	20.2.1999
► M17 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 455/2001 της Επιτροπής της 6ης Μαρτίου 2001	L 65	9	7.3.2001
► M18 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2042/2001 της Επιτροπής της 18ης Οκτωβρίου 2001	L 276	8	19.10.2001

- **M19** Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 796/2002 της Επιτροπής της 6ης Μαΐου 2002 L 128 8 15.5.2002

Διορθώνεται από:

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



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 διασφολίζεται 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 συνδυασμένης 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·

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

⁽¹⁾ ΕΕ αριθ. L 172 της 30. 9. 1966, σ. 3025/66.

⁽²⁾ ΕΕ αριθ. L 353 της 17. 12. 1990, σ. 23.

▼B

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:

Άρθρο 1

1. Θεωρούνται παρθένα ελαιόλαδα, κατά την έννοια του σημείου 1 στοιχεία α), β) και γ) του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, τα έλαια των οποίων τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα I σημεία 1, 2 και 3 του παρόντος κανονισμού.

2. Θεωρείται μειονεκτικό παρθένο έλαιόλαδο, κατά την έννοια του σημείου 1 στοιχείο δ) του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, το έλαιόλαδο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα I σημείο 4 του παρόντος κανονισμού.

3. Θεωρείται εξευγενισμένο έλαιόλαδο, κατά την έννοια του σημείου 2 του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, το έλαιο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα I σημείο 5 του παρόντος κανονισμού.

4. Θεωρείται έλαιόλαδο, κατά την έννοια του σημείου 3 του παραρτήματος του κανονισμού 136/66/ΕΟΚ, το έλαιο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα I σημείο 6 του παρόντος κανονισμού.

5. Θεωρείται ακατέργαστο πυρηνέλαιο ελιάς, κατά την έννοια του σημείου 4 του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, το πυρηνέλαιο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα I σημείο 7 του παρόντος κανονισμού.

6. Θεωρείται εξευγενισμένο πυρηνέλαιο, κατά την έννοια του σημείου 5 του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, το πυρηνέλαιο του οποίου τα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με εκείνα που αναφέρονται στο παράρτημα I σημείο 8 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 I σημείο 9 του παρόντος κανονισμού.

▼M15

8. Ωστόσο, για τις ►M18 περιόδους εμπορίας 1998/1999 έως 2002/2003 ◀, θεωρούνται επίσης ως παρθένα ελαιόλαδα, κατά την έννοια του σημείου 1α) β), γ) ή δ) του παραρτήματος του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ, τα χύδην ή σε άμεση συσκευασία για άμεση χρήση ελαιόλαδα καθαρού περιεχόμενου ίσου ή ανώτερου των 100 χιλιογράμμων, τα οποία κατάγονται καθ' ολοκληρίαν από το Μαρόκο, των οποίων τα χαρακτηριστικά είναι, αντίστοιχα, σύμφωνα προς εκείνα που προσδιορίζονται στο παράρτημα I σημεία 1, 2, 3 και 4 του παρόντος κανονισμού και, κατά παρέκκλιση των παραγράφων 1 και 2, των οποίων η περιεκτικότητα σε λινολενικό οξύ ανέρχεται κατ' ανώτατο όριο σε 1,0 %.

⁽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,
- για τον προσδιορισμό των κεκορεσμένων λιπαρών οξέων στη θέση 2 των τριγλυκεριδίων, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα VII,
- για τον προσδιορισμό της συνθέσεως των τριγλυκεριδίων, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα VIII,
- 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,
- για την δοκιμή του έξιευγενισμού, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα XIII,

▼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.

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 κατάσταση.

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 αντιπρόσωποι 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

▼ M19

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. Για τους ελέγχους που προβλέπονται στην παράγραφο 3, οι αναλύσεις που αναφέρονται στα παραρτήματα II, III, IX 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 πριν από τους τέσσερις μήνες που προηγούνται της λήξης της ημερομηνίας διατηρησιμότητας, οι εν λόγω αναλύσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται το αργότερο πριν από το τέλος του τέταρτου μήνα που ακολουθεί την ημερομηνία διενέργειας της δειγματοληψίας. Δεν εφαρμόζεται καμία αναβολή για τις άλλες αναλύσεις που προβλέπονται από τον υπόψη κανονισμό.

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.

▼ M5

Άρθρο ► **M19** 3 ◀

Στην περίπτωση που διαπιστώνεται ότι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός ελαιόλαδου διαφέρουν από εκείνα που προκύπτουν από την ονομασία του, το ενδιαφερόμενο κράτος μέλος επιβάλλει, με την επιφύλαξη άλλων ενδεχομένων κυρώσεων, διοικητικές χρηματικές ποινές, το ποσό των οποίων καθορίζεται ανάλογα με την σοβαρότητα της διαπιστωθείσας παρατυπίας.

▼ M5

Για την αξιολόγηση της παρατυπίας αυτής, λαμβάνεται υπόψη η φυσική εξέλιξη των χαρακτηριστικών ενός ελαιολάδου που διατηρείται υπό κανονικές συνθήκες.

Τα κράτη μέλη ενημερώνουν την Επιτροπή, στην αρχή κάθε εξαμήνου, για τον αριθμό και τη φύση των διαπιστωθεισών παρατυπιών καθώς και τις κυρώσεις που επέβαλαν στη διάρκεια του προηγούμενου εξαμήνου.

*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.

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

Άρθρο 7

Εφαρμόζονται οι κοινοτικές διατάξεις οι σχετικές με την παρουσία ανεπιθύμητων ουσιών, εκτός των ουσιών που αναφέρονται στο παράρτημα XI του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 8

1. Τα κράτη μέλη ανακοινώνουν στην Επιτροπή τα μέτρα που έχουν λάβει για την εφαρμογή του παρόντος κανονισμού.

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

▼B

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.

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 ►**Μ1** 1η Νοεμβρίου 1992 ◀, εξαιρουμένων των διαδικασιών των σχετικών με την παρέμβαση.

▼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 των ελαιολάδων ...
- ▼ **M17**
Παράρτημα Ia: Δειγματοληψία των παρτίδων ελαιόλαδου ή πυρηνελαίου σε άμεσες συσκευασίες των 100 λίτρων κατ' ανώτατο όριο ...
- ▼ **B**
Παράρτημα II: Προσδιορισμός οξύτητας ...
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: Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στη 2-δέση στα τριγλυκερίδια ελαίων και λιπών ...
Παράρτημα VIII: Προσδιορισμός περιεκτικότητας τριγλυκερίδιων ...
- ▼ **C1**
Παράρτημα IX: Φασματοφωτομετρική ανάλυσις στο υπεριώδες ...
- ▼ **B**
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 ...
- ▼ **C1**
Παράρτημα XI: Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του ελαιόλαδου σε αλογονούχους πτητικούς διαλύτες ...
- ▼ **B**
Παράρτημα XII: Οργανοληπτική αξιολόγηση του παρθένου ελαιόλαδου ...
Παράρτημα XIII: ► **M6** Εξουδετέρωση και αποχρωματισμός του ελαιόλαδου στο εργαστήριο ◀ ...
- ▼ **M19**

- ▼ **B**
Παράρτημα XV: Περιεκτικότητα σε έλαιο των ελαιοπυρήνων ...
Παράρτημα XVI: Προσδιορισμός του αριθμού ιωδίου ...
- ▼ **M11**
Παράρτημα XVII: Μέθοδος προσδιορισμού των στιγμασταδιενίων στα φυτικά έλαια ...
- ▼ **M13**
Παράρτημα XVIII: Μέθοδος προσδιορισμού της σύστασης τριγλυκερίδιων σε ECN42 ...
- ▼ **M19**
Παράρτημα XIX: Μέθοδος προσδιορισμού του περιεχομένου σε αλειφατικές αλκοόλες ...

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Κατηγορία	Οξύτητα (%) (*)	Δείκτης υπεροξειδίου mEq O ₂ /kg (*)	Αλογονωμένοι διαλύτες mg/kg (*) (1)	Κηροί mg/kg (**)	Κορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2 τριγλυκερίδια (%)	Στηγμιαστά-διένια mg/kg (3)	Διαφορά HPLC και ECN42: Θεωρητικός υπολογισμός	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	K ₂₇₀ ύστερα από διέλευση υπεράνω αλουμίνης (4)	Δ-K (*)	Οργανοληπτική αξιολόγηση Διάμεση τιμή του φρουτώδους (Μφ) (*)	Οργανοληπτική αξιολόγηση Διάμεση τιμή του ελαττώματος (Με) (*)
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	Mf > 0	Md = 0
2. Παρθένο ελαιόλαδο	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Mf > 0	Md ≤ 2,5
3. Κουράντε παρθένο ελαιόλαδο	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	—	Md ≤ 6,0 (4)
4. Λαμπάντε παρθένο ελαιόλαδο	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 300 (5)	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	—	—	Md > 6
5. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—	—
6. Ελαιόλαδο	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—	—
7. Ακατέργαστο πυρηνέλατο	> 0,5 (**)	—	—	> 350 (6)	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—	—
8. Εξευγενισμένο πυρηνέλατο	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—	—
9. Πυρηνέλατο	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—	—

(1) Συνολικό μέγιστο ανώτατο όριο για τις ολικές αλογονωμένες ενώσεις που ανιχνεύονται με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων.

Για τα στοιχεία που ανιχνεύονται μεμονωμένα, το ανώτατο όριο είναι 0,10 mg/kg.

(2) Αθροισμα ισομερών που θα μπορούσαν να διαχωριστούν (ή όχι) με τριχοειδή στήλη.

(3) Για να προσδιοριστεί η παρουσία εξευγενισμένων ελαίων, όταν το K₂₇₀ υπερβεί το όριο της σχετικής κατηγορίας, πρέπει να πραγματοποιηθεί νέος προσδιορισμός του K₂₇₀ ύστερα από διαβίβαση υπεράνω αλουμίνης.

(4) Εάν η διάμεση τιμή του φρουτώδους ισούται με 0, η διάμεση τιμή του ελαττώματος πρέπει να είναι κατώτερη ή ίση με 2,5.

(5) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς που περιλαμβάνεται μεταξύ 300 mg/kg και 350 mg/kg θεωρούνται ως λαμπάντε παρθένα ελαιόλαδα, αν οι ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι κατώτερες από ή ίσες με 350 mg/kg ή αν το ποσοστό σε ερυθροδιόλη και συβαόλη είναι κατώτερο ή ίσο του 3,5.

(6) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς που περιλαμβάνεται μεταξύ 300 mg/kg και 350 mg/kg θεωρούνται ως ακατέργαστα πυρηνέλαια, αν οι ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι ανώτερες από 350 mg/kg και αν το ποσοστό σε ερυθροδιόλη και συβαόλη είναι ανώτερο του 3,5.

Κατηγορία	Περιεκτικότητα σε οξέα						Αθροισμα των trans-ισομερών trans-ελαιϊκού οξέος (%)	Αθροισμα trans-λινο- και trans-λινολενικού οξέος (%)	Χολη-στερόλη (%)	Βρασι-καστερόλη (%)	Καμπι-στερόλη (%)	Στιγμα-στερόλη (%)	Β-σιτο-στερόλη (%) (1)	Δ-7-στιγμα-στερόλη (%)	Σύνολο στερόλε-ς (mg/kg)	Ερυθρο-διόλη και ουβαδόλη (%) (**)
	Μυρι-στικό (%)	Λινολε-νικό (%)	Αραχι-δικό (%)	Εικοσα-νικό (%)	Βεζε-νικό (%)	Λιγνο-πρικό (%)										
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιό-λαδο	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Παρθένο ελαιό-λαδο	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Κουράντε παρθένο ελαιό-λαδο	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
4. Λαμπάντε παρθένο ελαιό-λαδο	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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 (2)
5. Εξυγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Ελαιόλαδο	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
7. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (3)
8. Εξυγενισμένο πυρηνέλαιο	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,40	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
9. Πυρηνέλαιο	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,40	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

(1) Αθροισμα των: δ-5,23-στιγμασταδιενόλη + κλεροστερόλη + β-σιτοστερόλη + σιτοστανόλη + δ-5-αβεναστερόλη + δ-5,24-στιγμασταδιενόλη.

(2) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς που περιλαμβάνεται μεταξύ 300 mg/kg και 350 mg/kg θεωρούνται ως λαμπάντε παρθένα ελαιόλαδα, αν οι ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι κατώτερες από ή ίσες με 350 mg/kg ή αν το ποσοστό σε ερυθροδιόλη και ουβαδόλη είναι κατώτερο ή ίσο του 3,5.

(3) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς που περιλαμβάνεται μεταξύ 300 mg/kg και 350 mg/kg θεωρούνται ως ακατέργαστα πυρηνέλαια, αν οι ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι ανώτερες από 350 mg/kg και αν το ποσοστό σε ερυθροδιόλη και ουβαδόλη είναι ανώτερο του 3,5.

Σημειώσεις:

α) Τα αποτελέσματα των αναλύσεων πρέπει να εκφράζονται αναγράφοντας τον ίδιο αριθμό δεκαδικών ψηφίων με αυτά που προβλέπονται για κάθε χαρακτηριστικό.

Ο τελευταίος αριθμός πρέπει να αυξάνεται κατά μία μονάδα εάν ο τελευταίος αριθμός υπερβαίνει το 4.

β) Αρκεί και ένα μόνο χαρακτηριστικό να μην συμφωνεί με τις αναγραφόμενες αξίες ώστε το ελαιόλαδο να αλλάξει κατηγορία ή να δηλωθεί ότι δεν είναι σύμφωνο όσον αφορά την καθαρότητα.

γ) Τα χαρακτηριστικά που σημειώνονται με έναν αστερίσκο (*), τα οποία αναφέρονται στην ποιότητα του ελαιολάδου, συνεπάγονται ότι:

— για το λαμπάντε παρθένο ελαιόλαδο, τα σχετικά ανόματα όρια (με εξαίρεση το K_{232}) μπορεί να μην πληρούνται συγχρόνως,

— για τα άλλα παρθένα ελαιόλαδα, η μη τήρηση τουλάχιστον ενός των ορίων αυτών συνεπάγεται αλλαγή κατηγορίας, παραμένοντας όμως σε μία των κατηγοριών των παρθένων ελαιολάδων.

δ) Τα χαρακτηριστικά που αναγράφονται με δύο αστερίσκους (**) συνεπάγονται ότι, για όλα τα πυρηνέλαια που αφορούν τα σχετικά όρια, μπορούν να πληρούνται συγχρόνως.

▼ **M17***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ια***Δειγματοληψία παρτίδων ελαιολάδου ή πυρηνελαίου ελιών σε άμεσες συσκευασίες των 100 λίτρων κατ' ανώτατο όριο**

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

Όταν η συγκεκριμένη παρτίδα είναι μεγαλύτερη από 125 000 λίτρα, υποδιαιρείται σε ισόποσες επιμέρους παρτίδες, κατά προσέγγιση ίσες ή κατώτερες των 125 000 λίτρων. Στις επιμέρους παρτίδες που καθορίζονται με τον τρόπο αυτό εφαρμόζεται η εν λόγω μέθοδος.

1. Περιεχόμενο βασικής δειγματοληψίας

Κάθε βασική δειγματοληψία έχει ως εξής:

- α) στην περίπτωση κατά την οποία οι άμεσες συσκευασίες έχουν χωρητικότητα μικρότερη ή ίση με έξι λίτρα, το έλαιο μιας άμεσης συσκευασίας κατανέμεται σε έξι περιέκτες ενός λίτρου, εκ των οποίων:
- ένας περιέκτης για τις αναλύσεις που αναφέρονται στα παραρτήματα II, III, IX και XII,
 - ένας άλλος για τις άλλες αναλύσεις και
 - οι υπόλοιποι περιέκτες για ενδεχόμενες κατ' αντιπαράθεση αναλύσεις·
- β) στην περίπτωση κατά την οποία οι άμεσες συσκευασίες έχουν χωρητικότητα μεγαλύτερη ή ίση με δύο λίτρα και κατώτερη από έξι, το έλαιο τεσσάρων άμεσων συσκευασιών, εκ των οποίων:
- μια άμεση συσκευασία για τις αναλύσεις που αναφέρονται στα παραρτήματα II, III, IX και XII,
 - ένα τρίτο μιας άλλης συσκευασίας για τις άλλες αναλύσεις,
 - το υπόλοιπο έλαιο για τις ενδεχόμενες κατ' αντιπαράθεση αναλύσεις·
- γ) στην περίπτωση κατά την οποία οι άμεσες συσκευασίες έχουν χωρητικότητα μεγαλύτερη ή ίση 0,75 λίτρα και κατώτερη από δύο λίτρα, το έλαιο έξι άμεσων συσκευασιών, εκ των οποίων:
- μια άμεση συσκευασία για τις αναλύσεις που αναφέρονται στα παραρτήματα II, III, IX και XII,
 - μια άλλη συσκευασία για τις άλλες αναλύσεις και
 - το υπόλοιπο έλαιο για τις ενδεχόμενες κατ' αντιπαράθεση αναλύσεις·
- δ) στην περίπτωση κατά την οποία οι άμεσες συσκευασίες έχουν χωρητικότητα κατώτερη από 0,75 λίτρα, το έλαιο του ελάχιστου αριθμού συσκευασιών, των οποίων η συνολική χωρητικότητα υπερβαίνει 4,5 λίτρα, με την ακόλουθη κατανομή:
- το έλαιο του ελάχιστου αριθμού συσκευασιών, των οποίων η χωρητικότητα υπερβαίνει 0,75 λίτρα, προορίζεται για τις αναλύσεις που αναφέρονται στα παραρτήματα II, III, IX, XII,
 - η ίδια ποσότητα προορίζεται για τις άλλες αναλύσεις και
 - το υπόλοιπο φυλάσσεται για τις ενδεχόμενες κατ' αντιπαράθεση αναλύσεις.

2. Αριθμός βασικών δειγματοληψιών

Ο ελάχιστος αριθμός βασικών δειγματοληψιών καθορίζεται συναρτήσει του μεγέθους της παρτίδας σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

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

▼ **M17**

Οι άμεσες συσκευασίες μιας βασικής δειγματοληψίας πρέπει να επιλέγονται από γειτονικά σημεία στην παρτίδα.

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

3. Αναλύσεις και αποτελέσματα

Κατά το δυνατό, τα έλαια πρέπει να φυλάσσονται στους αρχικούς περιέκτες μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης.

α) Έκαστο από τα ληφθέντα βασικά δείγματα υποδιαιρείται σε εργαστηριακά δείγματα, σύμφωνα με το σημείο 2.25 της προδιαγραφής EN ISO 5555 προκειμένου να υποβληθεί στις ακόλουθες αναλύσεις:

- προσδιορισμός ελεύθερων λιπαρών οξέων, όπως αναφέρεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 πρώτη περίπτωση,
- προσδιορισμός του δείκτη υπεροξειδίου, όπως αναφέρεται στο άρθρο 2 παράγραφος 1 δεύτερη περίπτωση,
- φασμαφωτομετρική 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 μία των βασικών δειγματοληψιών επί της ίδιας παρτίδας, τα αποτελέσματα των αναλύσεων που αναφέρονται στο στοιχείο α) δεν ανταποκρίνονται στο σύνολό τους στα χαρακτηριστικά της κατηγορίας ελαίου που δηλώθηκε, το σύνολο της παρτίδας θεωρείται ότι δεν πληροί τα χαρακτηριστικά αυτά.

Στην περίπτωση που για καθεμία από τις βασικές δειγματοληψίες επί της ίδιας παρτίδας, όλα τα αποτελέσματα των αναλύσεων που αναφέρονται στο στοιχείο α) είναι ομοιογενή, λαμβανομένων υπόψη των χαρακτηριστικών επαναληψιμότητας των σχετικών μεθόδων, και ανταποκρίνονται στα χαρακτηριστικά της κατηγορίας ελαίου που δηλώθηκε, μια από τις βασικές δειγματοληψίες επί της εν λόγω παρτίδας υποβάλλεται στις υπόλοιπες αναλύσεις.

γ) Στην περίπτωση που ένα των αποτελεσμάτων των αναλύσεων που αναφέρονται στο στοιχείο β) δεύτερο εδάφιο δεν ανταποκρίνεται στα χαρακτηριστικά της κατηγορίας ελαίου που δηλώθηκε, το σύνολο της υπόψη παρτίδας θεωρείται ως μη σύμφωνο προς τα χαρακτηριστικά αυτά.

Στην περίπτωση που όλα τα αποτελέσματα των αναλύσεων που αναφέρονται στο στοιχείο β) δεύτερο εδάφιο ανταποκρίνονται στα χαρακτηριστικά της κατηγορίας ελαίου που δηλώθηκε, το σύνολο της παρτίδας θεωρείται σύμφωνο προς τα χαρακτηριστικά αυτά.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ

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 διαιθυλαιθέρος αιθανόλης 95 % [με αναλογία 1:1 (V/V)].

Προσοχή: Ο διαιθυλαιθέρας είναι εξαιρετικά εύφλεκτος και μπορεί να σχηματίζει εκρηκτικά υπεροξειδία. 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 φαινολοφθαλεΐνης (1.2.3) ανά 100 ml μείγματος.

Σημείωση: Εάν δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί διαιθυλαιθέρας, 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. Φαινολοφθαλεΐνη, 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

Συνθιτισμένοι εργαστηριακός εξοπλισμός, περιλαμβάνοντας:

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.

▼B

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 φαινολοφθαλεΐνης 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:

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

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 ΙΙΙ

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 οξείκου 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 πώματα, χωρητικότητας περίπου 250 ml, οι οποίες προηγουμένως έχουν ξηρανθεί και στις οποίες έχει διαβιβασθεί 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 οξείκο 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 πώματα, από αδιαφανές γυαλί ή φελλό.

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.

▼B

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). Ποματίζεται γρήγορα, γίνεται ανάδευση επί ένα λεπτό, και αφήνεται για 5 λεπτά ακριβώς, μακριά από το φως 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.

▼ M6

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΚΗΡΟΥΣ ΔΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΑΕΡΙΟΥ ΦΑΣΕΩΣ ΜΕ ΤΡΙΧΟΕΙΔΗ ΣΤΗΛΗ

1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος περιγράφει διαδικασία προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε κηρούς ορισμένων λιπαρών ουσιών υπό τις συνθήκες της δοκιμασίας.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση μεταξύ του ελαιολάδου που λαμβάνεται με έκθλιψη και εκείνου που λαμβάνεται με εκχύλιση (έλαιο εξ ελαιοπυρήνων).

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προσθήκη κατάλληλου εσωτερικού προτύπου στη λιπαρή ουσία και διαχωρισμός με χρωματογραφία σε στήλη silica gel. Παραλλαγή του πρώτου κλάσματος που εκλύεται υπό τις συνθήκες της δοκιμασίας (με πολικότητα μικρότερη εκείνης των τριγλυκεριδίων) και άμεση ανάλυση με αέριο χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- 3.1. Φιάλη Erlenmeyer των 25 ml.
- 3.2. Υάλινη στήλη χρωματογραφίας, εσωτερικής διαμέτρου 15,0 mm και ύψους 30 έως 40 cm.
- 3.3. Κατάλληλος χρωματογράφος αερίου φάσεως με τριχοειδή στήλη, εφοδιασμένος με σύστημα απευθείας εισαγωγής στη στήλη αποτελούμενος από:
 - 3.3.1. Θερμοστατικό κλίβανο για τις στήλες ικανό να διατηρεί την επιθυμητή θερμοκρασία με ακρίβεια ± 1 °C.
 - 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 δυνάμενο να λειτουργεί με τον μετατροπέα-ενισχυτή (βλέπε 3.3.3), με χρόνο απόκρισης που δεν υπερβαίνει το 1 δευτερόλεπτο και μεταβλητή ταχύτητα χαρτιού.
 - 3.3.5. Τριχοειδή στήλη από γυαλί ή τετηγμένο διοξειδίο του πυριτίου, ►C2 μήκους 10 έως 15 m ◄, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, επικαλυμμένη εσωτερικά με υγρό SE-54 ή κάτι αντίστοιχο, ομοιόμορφου πάχους 0,10 έως 0,30 μm.
- 3.4. Μικροσύριγγα των 10 μl κατάλληλη για έγχυση στη στήλη με βελόνα από επιφανειακώς σκληρυμένο χάλυβα (aiguille cimentée).

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 4.1. Πυριτιωμένη ζελατίνη (silica gel) 70 έως 230 mesh, 7754 Merck.

Η πυριτιωμένη ζελατίνη τοποθετείται στον κλίβανο σε θερμοκρασία 500 °C επί τέσσερις ώρες. Μετά από ψύξη, προστίθεται νερό σε αναλογία 2 %. Το μείγμα αναδεύεται μέχρις ότου ομογενοποιηθεί και διατηρείται στο σκοτάδι επί 12 τουλάχιστον ώρες πριν χρησιμοποιηθεί.
- 4.2. Κανονικό εξάνιο, για χρωματογραφία.
- 4.3. Αιθυλαιθέρας, για χρωματογραφία.
- 4.4. Κανονικό επτάνιο, για χρωματογραφία.
- 4.5. Πρότυπο διάλυμα λαυρικής αραχιδικής ένωσης 0,1 % κατ' όγκο μέσα στο εξάνιο (εσωτερικό πρότυπο).
- 4.6. Φέρον αέριο: υδρογόνο χρωματογραφικής καθαρότητας, για χρωματογραφία αερίου φάσεως.
- 4.7. Βοηθητικά αέρια:
 - υδρογόνο χρωματογραφικής καθαρότητας, για χρωματογραφία αερίου φάσεως,

▼ **M6**

— αέρας χρωματογραφικής καθαρότητας, για χρωματογραφία αερίου φάσεως.

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1. Διαχωρισμός του κλάσματος των κηρών.

5.1.1. Προετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης.

Φέρονται σε αιώρηση 15 g ένυδρου silica gel σε αναλογία 21 % μέσα στο άνυδρο κανονικό εξάνιο και το μείγμα εισάγεται στη στήλη.

Μετά από αυτόματη καθίζηση, αναδεύεται με τη βοήθεια ηλεκτρικού αναδευτήρα ώστε το χρωματογραφικό στρώμα να γίνει πιο ομογενές. Διηθούνται 30 ml κανονικού εξανίου για απομάκρυνση τυχόν ξένων προσμείξεων.

5.1.2. Εκτέλεση της χρωματογραφίας επί στήλης.

Ζυγίζονται με ακρίβεια 500 mg του δείγματος εκτός της φιάλης Ertenmeyer των 25 ml, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα εσωτερικού προτύπου, ανάλογα με την εκτιμώμενη περιεκτικότητα σε κηρούς. Για παράδειγμα, προστίθεται 0,1 mg λαυρικής αραχιδικής ένωσης στην περίπτωση του ελαιολάδου, και 0,25 έως 0,50 mg στην περίπτωση του πυρηνελαίου.

Το παραπάνω δείγμα μεταφέρεται στη στήλη (στην οποία έχει γίνει η προετοιμασία που περιγράφεται στο σημείο 5.1.1) με τη βοήθεια δύο ποσοτήτων κανονικού εξανίου των 2 ml η καθεμία.

Ο διαλύτης αφήνεται να ρεύσει μέχρι ύψους 1 mm υπεράνω του απορροφητικού υλικού, οπότε αρχίζει η χρωματογραφική έκλυση. Συλλέγονται 140 ml μείγματος κανονικού εξανίου-αιθυλαιθέρα 99:1, με ροή 15 περίπου σταγόνων ανά 10 δευτερόλεπτα (2,1 ml/min).

Το ούτο λαμβανόμενο κλάσμα ξηραίνεται μέσα στον περιστροφικό βραστήρα μέχρι πλήρους σχεδόν εξατμίσεως του διαλύτη. Τα εναπομένοντα 2 ή 3 ml διαλύτου απομακρύνονται διά διαβίβασεως ελαφρού ρεύματος αζώτου. Εν συνεχεία, προστίθενται 10 ml κανονικού επτανίου.

5.2. Ανάλυση διά χρωματογραφίας αερίου φάσεως.

5.2.1. Προκαταρκτικές εργασίες, ρύθμιση της στήλης.

5.2.1.1. Τοποθετείται η στήλη μέσα στον χρωματογράφο αερίου φάσεως, διά συνδέσεως του άκρου εισόδου με το σύστημα «επί στήλης» (on-column) και το άκρο εξόδου με τον ανιχνευτή.

Πραγματοποιούνται οι συνήθεις έλεγχοι της συσκευής χρωματογραφίας αερίου φάσεως (στεγανότητα των κυκλωμάτων των αερίων, αποτελεσματικότητα του ανιχνευτή και του συστήματος καταγραφής, κ.λπ.).

5.2.1.2. Αν η στήλη χρησιμοποιείται για πρώτη φορά, συνιστάται η ρύθμισή της. Διαβιβάζεται ελαφρό ρεύμα αερίου μέσω της στήλης και εν συνεχεία η συσκευή τίθεται σε λειτουργία. Θερμαίνεται σταδιακά μέχρι θερμοκρασίας κατά 20 °C τουλάχιστον υψηλότερης από τη θερμοκρασία λειτουργίας (βλέπε σημείωση). Η θερμοκρασία αυτή διατηρείται επί 2 τουλάχιστον ώρες και εν συνεχεία γίνεται ρύθμιση της συσκευής στις συνθήκες λειτουργίας (ρύθμιση της ροής των αερίων, αφή της φλόγας, σύνδεση με τον ηλεκτρονικό καταγράφεα, ρύθμιση της θερμοκρασίας του θαλάμου για τη στήλη, ρύθμιση του ανιχνευτή, κ.λπ.) και καταγράφεται το σήμα με ευαισθησία τουλάχιστον δύο φορές μεγαλύτερη από την προβλεπόμενη για την εκτέλεση της ανάλυσης. Η βασική καμπύλη πρέπει να είναι γραμμική, χωρίς κορυφές και παρεκκλίσεις.

Ευθύγραμμη αρνητική παρέκκλιση σημαίνει κακή επαφή των συνδέσεων της στήλης· αρνητική παρέκκλιση σημαίνει ανεπαρκή ρύθμιση της στήλης.

Σημείωση: Η θερμοκρασία ρύθμισης θα πρέπει πάντως να είναι κατά 20 °C τουλάχιστον χαμηλότερη από τη μέγιστη θερμοκρασία που προβλέπεται για το χρησιμοποιούμενο υγρό έκλυσης.

▼ **M6**

5.2.2. Επιλογή των συνθηκών εργασίας

5.2.2.1. Κατά γενικών κανόνα, έχουν ως εξής:

- θερμοκρασία της στήλης: 80 °C στην αρχή, αύξηση εν συνεχεία κατά 30 °C/min μέχρι τους 120 °C και κατόπιν προγραμματισμένη αύξηση κατά 5 °C/min μέχρι τους 340 °C,
- θερμοκρασία του ανιχνευτή: 350 °C,
- γραμμική ταχύτητα του φέροντος αερίου: υδρογόνο 20 έως 35 cm/s,
- ευαισθησία των οργάνων: το 4-πλάσιο έως 16-πλάσιο της ελάχιστης εξασθένησης,
- ευαισθησία καταγραφής: 1 έως 2 mV της βασικής κλίμακας,
- ταχύτητα εκτύλιξης του χαρτιού: 30 cm/h,
- ποσότητα εγχέομενης ουσίας: 0,5 έως 1 μl διαλύματος.

Οι συνθήκες αυτές μπορούν να μεταβάλλονται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της στήλης και της συσκευής έτσι ώστε να λαμβάνονται χρωματογραφήματα που να ικανοποιούν τις ακόλουθες συνθήκες:

- ο χρόνος κατακράτησης C 32 πρέπει να είναι 25 ± 2 min, και
- η αντιπροσωπευτικότερη κορυφή των κηρών πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 60 και 100 % της βασικής κλίμακας.

5.2.2.2. Οι παράμετροι ολοκλήρωσης των κορυφών πρέπει να καθορίζονται κατά τρόπον ώστε να υπολογίζονται σωστά τα εμβαδά των εξεταζόμενων καμπυλών.

5.2.3. Εκτέλεση της ανάλυσης

5.2.3.1. Λαμβάνεται 1 μl διαλύματος με τη μικροσύριγγα των 10 μl και αποσύρεται το έμβολο της σύριγγας έτσι ώστε η βελόνα να αδειάσει. Εισάγεται η βελόνα στη διάταξη έγχυσης και μετά από 1 έως 2 sec εγγέεται το διάλυμα γρήγορα. Μετά από 5 sec περίπου, η βελόνα αφαιρείται αργά.

5.2.3.2. Γίνεται καταγραφή μέχρι πλήρους εκλούσεως των κηρών.

Η βασική καμπύλη πρέπει πάντοτε να ανταποκρίνεται στις απαιτούμενες συνθήκες (βλέπε σημείο 5.2.1.2).

5.2.4. Αναγνώριση των κορυφών

Η αναγνώριση των διαφόρων κορυφών πρέπει να γίνεται βάσει των χρόνων κατακράτησης και διά συγκρίσεως με μείγματα κηρών γνωστών χρόνων κατακράτησης, που αναλύθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες.

Το σχήμα 1 εμφανίζει χρωματογράφημα κηρών παρθένου ελαιολάδου.

5.2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός

5.2.5.1. Υπολογίζονται τα εμβαδά των καμπυλών του εσωτερικού προτύπου και των αλειφατικών εστέρων με άτομα άνθρακος από 40 έως 46, με τη βοήθεια του ολοκληρωτή.

5.2.5.2. Υπολογίζεται (σε mg/kg λιπαρής ουσίας) η περιεκτικότητα σε κηρούς (για καθένα από τους εστέρες) βάσει του τύπου:

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

όπου:

A_x = εμβαδόν της καμπύλης κάθε εστέρα

A_s = εμβαδόν της καμπύλης της λαυρικής αραχιδικής ένωσης

m_s = μάζα της προστιθέμενης λαυρικής αραχιδικής ένωσης, σε mg

m = μάζα του αφαιρούμενου για τον προσδιορισμό δείγματος, σε g.

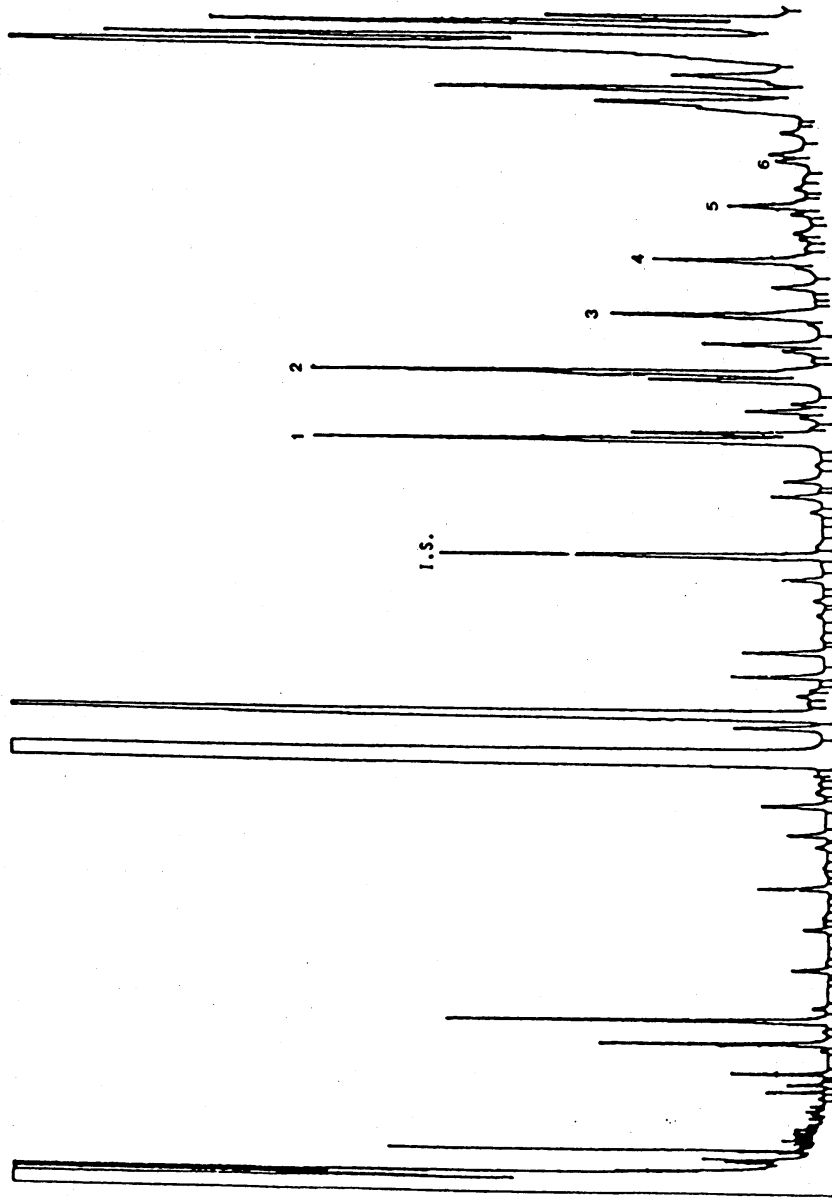
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δίδεται η περιεκτικότητα σε καθέναν από τους κηρούς, καθώς και η συνολική τους περιεκτικότητα, σε mg/kg λιπαρής ουσίας.

▼M6**ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ***Προσδιορισμός της γραμμικής ταχύτητας του αερίου*

Εγχέονται 1 έως 3 μl μεθανίου (ή προπανίου) στον χρωματογράφο αερίου φάσεως, μετά τη ρύθμισή του σε κανονικές συνθήκες λειτουργίας. Χρονομετρείται η διαδρομή του αερίου μέσω της στήλης από τη στιγμή της έγχυσης μέχρι τη στιγμή εμφάνισης της κορυφής.

Η γραμμική ταχύτητα (σε cm/sec) δίδεται από το κλάσμα L/tM , όπου L το μήκος της στήλης σε cm και tM ο μετρηθείς χρόνος σε sec.



ΣΧΗΜΑ 1: Χρωματογράφημα κτηνών παράσιτου ελασολίδου

Ε.Π. = Εσωτερικό πρότυπο εστέρας C32 (με 32 άτομα άνθρακος)

1 = Εστέρας C36

2 = Εστέρας C38

3 = Εστέρας C40

4 = Εστέρας C42

5 = Εστέρας C44

6 = Εστέρας C46



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 τριμεθυλοσιλλαιθέρες 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 προσαρμόσιμο 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 ► **CI** 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.

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

▼B

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 τριμεθυλοσιλιλαιθέρων 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 ασαπνοποίητων 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 αποξηραθεί, έπειτα ζυγίζονται ακριβώς 5 g ξηρού διηθημένου δείγματος στην ίδια σφαιρική φιάλη.

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.

▼B

- 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 εκχυλίσεις 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 κάλιου (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.

- 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 εναπόθεσης, 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

▼B

20 °C. Κλείνεται αμέσως ο θάλαμος με το σκέπασμα και αφήνεται μέχρις ότου το μέτωπο του διαλύτη 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'διχλωροφλουοροσκεΐνης. 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 κονιοποιείται, 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, μεταγίγεται 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 τριμεθυλοσιλιλαιθέρων.
- 5.3.1. Στο σωλήνα που περιέχει το στερολικό κλάσμα προστίθεται το αντιδραστήριο σιλανοποίησης αποτελούμενο από μείγμα πυριδίνης-εξαμεθυλοδισιλαζάνιου-τριμεθυλοχλωρισιλάνιου 9/3/1 (V/V/V) (Σημείωση 4) σε αναλογία 50 ml ανά χιλιστό του γραμμαρίου των στερολών, αποφεύγοντας κάθε απορρόφηση υγρασίας (Σημείωση 5).

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

- 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 χρωματογρα-

▼B

φίας 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 ± 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,
- ποσότητα εγχόμενης 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 κλίμακος, για το σογιέλαιο (μέσο περιεχόμενο 20 %) 80 ± 10 % της πλήρους κλίμακος,
- πρέπει να γίνεται διαχωρισμός όλων των υπάρχουσών 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 έκλουση 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

▼B

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 εκκλούνται με την ακόλουθη σειρά: χοληστερόλη, βρασικαστερόλη, ►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:

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

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,

m = 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.

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

όπου:

A_x = εμβαδόν της κορυφής x,

ΣA = άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών.



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 χρονομετρώνται 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

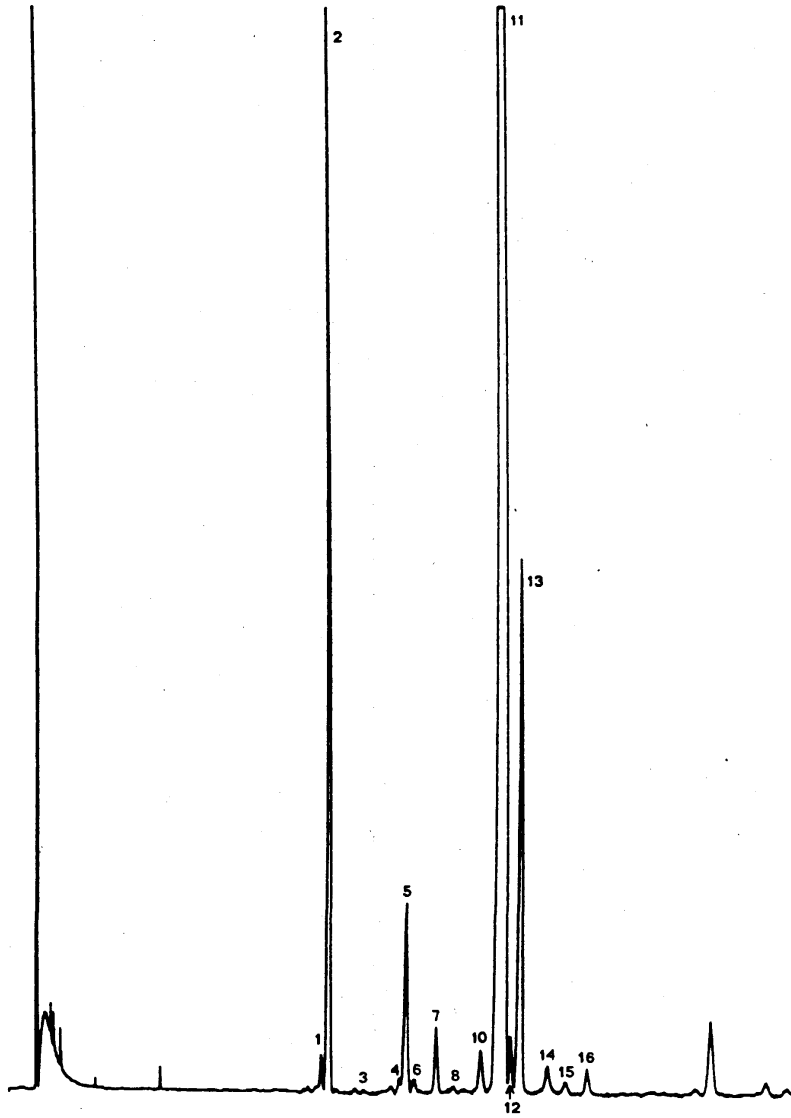
Σχετικοί χρόνοι κατακράτησης των στερολών

Κορυφή	Ταυτοποίηση		Σχετικός χρόνος κατακράτησης	
			Στήλη SE 54	Στήλη SE 52
1	χοληστερόλη	Δ5-χοληστεν-3β-ολη	0,67	0,63
2	►C1 χολεστανόλη ◀	5α-χολησταν-3β-ολη	0,68	0,64
3	βρασσικαστερόλη	[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	►C1 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 στιγμασταδιενόλη	[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	►C1 17-αβεναστερόλη ◀	[24Z]-24-αιθυλιδεν-Δ7-χολεστεν-3β-ολη	1,16	1,16

▼B

Σχήμα 1

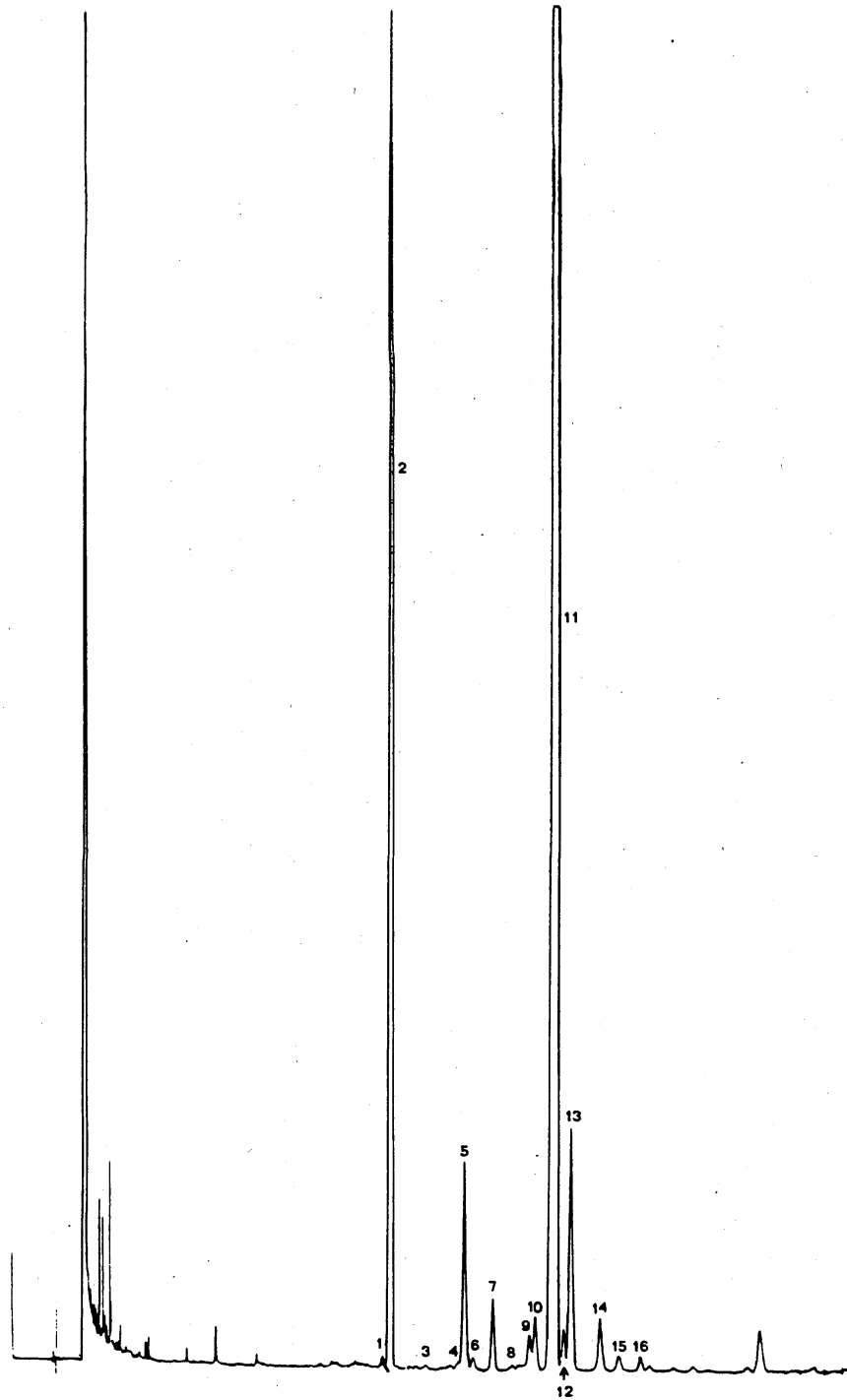
Χρωματογραφία αέριας φάσης του στερολικού κλάσματος ακατέργαστου ελαιολάδου



▼B

Σχήμα 2

Χρωματογραφία αέριας φάσης του στερολικού κλάσματος εξευγενισμένου
ελατιολάδου





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 εκχυλίσεως 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 εκχυλίσεως.

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 αλουμίνας.

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 διχλωροφλουορεσκειΐνης ◄. Όταν η πλάκα παρατηρείται υπό υπεριώδες φώς, οι στοιβάδες των στερολών και της ερυθροδιόλης μπορούν να αναγνωρισθούν από την ευθυγράμμιση 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 τριμεθυλοσιλυλοαιθέρων.

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 εκλουσθούν 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:

$$\begin{aligned} A_1 &= \text{εμβαδό} \quad \text{κορυφής} \quad \text{ερυθροδιόλης} \\ &\quad \text{►M6} \text{ ————— ◄}, \\ A_2 &= \text{εμβαδό} \quad \text{κορυφής} \quad \text{ουβαόλης} \\ &\quad \text{►M6} \text{ ————— ◄}, \\ \sum A_{\text{στερολών}} &= \text{ολικό} \quad \text{εμβαδό} \quad \text{κορυφών} \quad \text{στερολών} \\ &\quad \text{►M6} \text{ ————— ◄}. \end{aligned}$$

Το αποτέλεσμα εκφράζεται με ένα δεκαδικό ψηφίο.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΗ 2-ΘΕΣΗ ΣΤΑ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ ΕΛΑΙΩΝ ΚΑΙ ΛΙΠΩΝ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Το κείμενο αυτό περιγράφει μία ►CI μέθοδο προσδιορισμού της συνθέσεως ◄ αυτού του κλάσματος των λιπαρών οξέων ενός ελαίου ή λίπους που εστεροποιείται στη 2-θέση (β, ή εσωτερική θέση) της γλυκερίνης.

2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος αυτή είναι εφαρμόσιμη σε έλαια και λίπη με σημείο τήξης κάτω από 45 °C, λόγω ►CI εκλεκτικής δράσης ◄ της παγκρεατικής λιπάσης.

Δεν είναι απολύτως εφαρμόσιμη σε έλαια και λίπη περιέχοντα σημαντικές ποσότητες λιπαρών οξέων με δώδεκα ή λιγότερα άτομα άνθρακα (έλαια κοκοφοίνικα και φοινικόψυχας, λίπος βούτυρου), ή πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (με περισσότερους από τέσσερις διπλούς δεσμούς) περιέχοντα είκοσι ή περισσότερα άτομα άνθρακα (έλαια ψαριών και υδρόβιων ζώων), ή λιπαρά οξέα περιέχοντα οξυγονωμένες ομάδες, εκτός από την όξινη ομάδα.

3. ΑΡΧΗ

Πιθανή εξουδετέρωση όξινων ελαίων και λιπών σε διαλύτη. Καθαρισμός με διέλευση από στήλη αλουμίνας. Μερική υδρόλυση των τριγλυκεριδίων με παγκρεατική λιπάση επί ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα. Διαχωρισμός των σχηματιζόμενων μονογλυκεριδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και μεθανόλυση των μονογλυκεριδίων αυτών. Ανάλυση των μεθυλεστερών αυτών με ►CI αέρια χρωματογραφία ◄.

4. ΟΡΓΑΝΑ

- 4.1. Φιάλη των 100 ml με στρογγυλή βάση.
- 4.2. Φιάλη των 25 ml με στρογγυλή βάση, και εσμήρυσμα.
- 4.3. Αεροψυκτήρας, μήκους ενός μέτρου, που μπορεί να προσαρμοστεί στη φιάλη που αναφέρεται στο σημείο 4.2.
- 4.4. Κωνική φιάλη των 250 ml.
- 4.5. Ποτήρι ζέσης των 50 ml.
- 4.6. Διαχωριστική χοάνη των 500 ml.
- 4.7. Γυάλινη στήλη χρωματογραφίας, εσωτερικής διαμέτρου 13 mm, μήκους 400 mm, εξοπλισμένη με διάτρητο γυάλινο δίσκο και πόμα.
- 4.8. Σωλήνας φυγοκέντρωσης των 10 ml, με πόμα από αδιαφανές γυαλί.
- 4.9. Προχοΐδα των 5 ml, βαθμονομημένη ανά 0,05 ml.
- 4.10. Υποδερμική σύριγγα του 1 ml, εξοπλισμένη με λεπτή βελόνα.
- 4.11. Μικροσύριγγα για παροχή σταγονών των 3-4 μl.
- 4.12. Επιστρωτής για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.
- 4.13. Γυάλινες πλάκες για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, (20 × 20 cm).
- 4.14. Γυάλινη δεξαμενή ανάπτυξης για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, με κάλυμμα από αδιαφανές γυαλί, κατάλληλο για τις πλάκες των 20 × 20 cm.
- 4.15. Ψεκαστήρας για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.
- 4.16. Φούρνος ρυθμισμένος στους 103 ± 2 °C.
- 4.17. Θερμοστάτης με δυνατότητα ρύθμισης μεταξύ 30 και 45 °C, ανά 0,5 °C.
- 4.18. Περιστρεφόμενος εκκαρωτής.
- 4.19. Δονούμενος ηλεκτρικός αναμείκτης, κατάλληλος για ζωηρή ανατάραξη του σωλήνα της φυγοκέντρωσης.

▼B

4.20. Λυχνία υπεριώδους για την εξέταση των πλακών λεπτής στοιβάδας.

Για τον έλεγχο της ενεργότητας της λιπάσης:

- 4.21. Πεχάμετρο.
- 4.22. Σπειροειδής αναδευτήρας.
- 4.23. Προχοΐδα των 5 ml.
- 4.24. Χρονόμετρο.

Για την πιθανή παρασκευή της λιπάσης:

4.25. Εργαστηριακός αναδευτήρας, κατάλληλος για τη διασπορά και ανάμειξη ετερογενών υλικών.

5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 5.1. η-εξανίο, ή, αν δεν υπάρχει, πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ. 30-50 °C), χρωματογραφικού βαθμού.
- 5.2. 2-προπανόλη (ή αιθανόλη), 95 % (V/V), αναλυτικού βαθμού.
- 5.3. 2-προπανόλη (ή αιθανόλη), υδατικό διάλυμα 1/1.
- 5.4. Διαιθυλικός αιθέρας, απηλλαγμένος, υπεροξειδίων.
- 5.5. Ακετόνη.
- 5.6. Μυρμηγκικό οξύ, τουλάχιστον 98 % (m/m).
- 5.7. Διάλυμα ανάπτυξης: μείγμα η-εξανίου (5.1), διαιθυλικού αιθέρα (5.4) και μυρμηγκικού οξέος (5.6) σε αναλογία 70/30/1 (V/V/V).
- 5.8. Ενεργή αλουμίνα για χρωματογραφία, ουδέτερη, βαθμού Brockmann 1.
- 5.9. Σκόνη πυριτίου, με συζευτικό, κατάλληλης ποιότητας για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.
- 5.10. Παγκρεατική λιπάση, κατάλληλης ποιότητας (σημειώσεις 1 και 2).
- 5.11. Υδροξειδίο νατρίου σε υδατικό διάλυμα (120 g/l).
- 5.12. Υδροχλωρικό οξύ σε υδατικό διάλυμα (6 N).
- 5.13. Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂) σε υδατικό διάλυμα (220 g/l).
- 5.14. Χολικό νάτριο (ενζυματική ποιότητα) σε υδατικό διάλυμα (1 g/l).
- 5.15. Ρυθμιστικό διάλυμα: υδατικό διάλυμα 1 M τρί-υδροξυμεθυλαμινομεθανίου φέρεται σε pH 8 με προσθήκη υδροχλωρικού οξέος (5.12) (έλεγχος με ποτενσιόμετρο).
- 5.16. Φαινολοφθαλεΐνη σε διάλυμα (10 g/l) σε 95 % (V/V) αιθανόλη.
- 5.17. 2',7'Διχλωροφλουορεσκεΐνη σε διάλυμα (2 g/l) σε 95 % (V/V) αιθανόλη, καθιστάμενη ελαφρά αλκαλική, με προσθήκη μιας σταγόνας διαλύματος 1N υδροξειδίου νατρίου ανά 100 ml.

Και για τον έλεγχο της ενεργότητας της λιπάσης:

- 5.18. Εξουδετερωμένο έλαιο.
- 5.19. Υδροξειδίο νατρίου σε υδατικό διάλυμα (0,1 N).
- 5.20. Χολικό νάτριο (ενζυματική ποιότητα) σε υδατικό διάλυμα (200 g/l).
- 5.21. Αραβικό κόμμα σε υδατικό διάλυμα (100 g/l).

6. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Εάν το δείγμα έχει οξύτητα κάτω από 3 %, προσδιοριζόμενη σύμφωνα με το παράρτημα II καθαρίζεται αμέσως μέσα από αλουμίνα όπως υποδεικνύεται στο σημείο 6.2. Εάν το δείγμα έχει οξύτητα πάνω από 3 %, προσδιοριζόμενη σύμφωνα με το παράρτημα II εξουδετερώνεται με άλαλι παρουσία διαλύτη κατά την 6.1, κατόπιν διέρχεται από αλουμίνα όπως υποδεικνύεται στο σημείο 6.2.

- 6.1. Εξουδετέρωση άλαλι με παρουσία διαλύτη

Σε διαχωριστική χοάνη (4.6) εισάγονται περίπου 10 g ακατέργαστου ελαίου και προστίθενται 100 ml εξανίου (5.1), 50 ml 2-προπανόλης

▼B

(5.2), λίγες σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης (5.16) και μία ποσότητα του διαλύματος υδροξειδίου νατρίου (5.11) αντιστοιχούσα στην ελεύθερη οξύτητα του ελαίου συν 0,3 % επιπλέον. Δονούνται ζωηρά επί ένα λεπτό, προστίθενται 50 ml απεσταγμένου νερού, δονούνται ξανά και αφήνονται να ηρεμήσουν.

Μετά το διαχωρισμό, απομακρύνεται το στρώμα σάπωνα του πυθμένα. Επίσης αφαιρείται κάθε ενδιάμεσο στρώμα (γλίστρα, αδιάλυτη ύλη). Το διάλυμα εξανίου του εξουδετερωμένου ελαίου εκπλύεται με διαδοχικές δόσεις των 25-30 ml διαλύματος 2-προπανόλης (5.3) έως ότου το ρόδινο χρώμα της φαινολοφθαλεΐνης εξαφανιστεί.

Το περισσότερο από το εξάνιο απομακρύνεται με απόσταξη υπό κενό στον περιστρεφόμενο εξαερωτή (4.18), το έλαιο ξηραίνεται στους 30-40 °C υπό κενό με τη βοήθεια ρεύματος καθαρού αζώτου έως ότου το εξάνιο έχει τελειώς απομακρυνθεί.

6.2. Καθαρισμός μέσα από αλουμίνα

Παρασκευάζεται αιώρημα 15 g ενεργής αλουμίνας (5.8) σε 50 ml εξανίου (5.1) και εισάγεται, με ανάδευση, στη χρωματογραφική στήλη (4.7). Η αλουμίνα αφήνεται να κατακαθίσει ομοιόμορφα, και το επίπεδο του διαλύτη αφήνεται να πέσει έως 1-2 mm πάνω από το απορροφητικό. Εισάγεται προσεκτικά στη στήλη διάλυμα 5 g ελαίου σε 25 ml εξανίου (5.1). συλλέγεται το σύνολο του εκλύσματος από τη στήλη σε φιάλη στρογγυλής βάσης (4.1).

7. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Οι γυάλινες πλάκες (4.13) καθαρίζονται επιμελώς με αιθανόλη, πετρελαϊκό αιθέρα και ακετόνη για να εξαφανιστεί κάθε ίχνος λιπαρής ουσίας.

Σε κωνική φιάλη (4.4) τοποθετούνται 30 g σκόνης πυριτίου (5.9). Προστίθενται 60 ml απεσταγμένου νερού. Πωματίζεται και αναδεύεται ζωηρά επί ένα λεπτό. Ο πολτός μεταφέρεται αμέσως στον επιστρωτή (4.12) και οι καθαρές πλάκες επιστρώνονται με στρώμα πάχους 0,25 mm. Οι πλάκες στεγνώνονται στον αέρα επί 15 λεπτά και μετά επί μία ώρα στο φούρνο (4.16) στους 103 ± 2 °C.

Οι πλάκες ψύχονται σε ►C1 ξηραντήρα ◀ σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση.

Παρασκευασμένες πλάκες είναι διαθέσιμες στο εμπόριο.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ

8.1. Υδρόλυση με παγκρεατική λιπάση

Μέσα στο σωλήνα της φυγοκέντρωσης (4.8) ζυγίζεται περίπου 0,1 g του παρασκευασμένου δείγματος· εάν είναι στερεό λίπος, πρέπει να διαλυθεί σε 0,2 ml εξανίου (5.1) με ελαφριά θέρμανση, εάν χρειαστεί.

Προστίθενται 20 mg λιπάσης (5.10) και 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος (5.15). Αναδεύονται καλά, αλλά προσεκτικά, και μετά προστίθενται 0,5 ml διαλύματος χολικού νατρίου (5.14) και 0,2 ml διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (5.13). Ο σωλήνας κλείνεται με το πώμα, αναδεύεται προσεκτικά (αποφεύγεται η ύγρανση του πώματος) και τοποθετείται αμέσως στο θερμοστάτη (4.17), διατηρούμενου στους $40 \pm 0,5$ °C και αναδεύεται με το χέρι επί ακριβώς ένα λεπτό.

Ο σωλήνας απομακρύνεται από το θερμοστάτη, και αναταράσσεται ζωηρά με τον ηλεκτρικό αναδευτήρα (4.19) επί ακριβώς δύο λεπτά.

Ψύχεται αμέσως σε τρέχον νερό· προστίθεται 1 ml υδροχλωρικού οξέος (5.12) και 1 ml διαιθυλικού αιθέρα (5.4). Πωματίζεται και αναμιγνύεται ζωηρά με τον ηλεκτρικό αναδευτήρα. Αφήνεται να ηρεμήσει και απομακρύνεται η αιθερική στοιβάδα με σύριγγα (4.10), μετά από φυγοκέντρωση, εάν χρειαστεί.

8.2. Διαχωρισμός των μονογλυκεριδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Το εκχύλισμα τοποθετείται στη χρωματογραφική πλάκα με μικροσύριγγα (4.11) περίπου 1,5 cm από την κάτω άκρη, σε μία λεπτή, ομοιόμορφη γραμμή, στενή όσο γίνεται. Η πλάκα τοποθετείται σε καλά κορεσμένο λουτρό αναπτύξεως (4.14) και αναπτύσσεται με το διάλυμα ανάπτυξης (5.7) στους 20 °C περίπου, μέχρι περίπου 1 cm από την επάνω άκρη της πλάκας.

▼B

Οι πλάκες ξηραίνονται στον αέρα, στη θερμοκρασία του λουτρού, και ψεκάζονται με διάλυμα 2',7'διχλωροφλουορεσκεΐνης (5.17). Η στοιβάς των μονογλυκεριδίων (R_f περίπου 0,035) αναγνωρίζεται κάτω από υπεριώδες φώς (4.20).

8.3. Ανάλυση των μονογλυκεριδίων με ►C1 αέρια ◀ χρωματογραφία

Απομακρύνεται η στοιβάδα που αποκτήθηκε στην 8.2 με τη βοήθεια σπάτουλας (αποφεύγεται η απομάκρυνση συστατικών που απομένουν στη γραμμή της βάσης) και μεταφέρεται στη φιάλη μεθυλίωσης (4.2).

Το συλλεγμένο πυρίτιο επεξεργάζεται κατευθείαν όπως περιγράφεται στο παράρτημα X-B, έτσι ώστε να μετατραπούν τα μονογλυκερίδια σε μεθυλεστέρες, και μετά οι εστέρες εξετάζονται με αέριο χρωματογραφία, όπως περιγράφεται στο παράρτημα X-A.

9. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπολογίζεται η ►C1 σύνθεση ◀ των λιπαρών οξέων στη 2-θέση με ακρίβεια ενός δεκαδικού (Σημείωση 3).

10. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

1. Έλεγχος της ενεργότητας της λιπάσης

Παρασκευάζεται ελαιώδες γαλάκτωμα με ανάδευση μείγματος 165 ml διαλύματος αραβικού κόμμεως (5.21), 15 g κομματιασμένου πάγου και 20 ml εξουδετερωμένου έλαιου (5.18) σε κατάλληλο αναδευτήρα.

Σε ένα ποτήρι ζέσης (4.5) τοποθετούνται 10 ml του γαλακτώματος αυτού, ακολουθούμενα διαδοχικά από 0,3 ml διαλύματος χολικού νατρίου (5.20) και 20 ml απεσταγμένου νερού.

Το ποτήρι τίθεται σε θερμοστάτη διατηρούμενο στους $37 \pm 0,5$ °C (σημείωση 4)· εισάγονται τα ηλεκτρόδια ενός πεχάμετρου (4.21) και ένας σπειροειδής αναδευτήρας (4.22).

Με μία προχοΐδα (4.23) προστίθεται κατά σταγόνες το διάλυμα υδροξειδίου νατρίου (5.19) έως ότου το pH γίνει 8.5.

Προστίθεται επαρκής ποσότης υδατικού αιωρήματος λιπάσης (βλέπε κατωτέρω). Όταν το πεχάμετρο δείξει τιμή pH 8,3, τίθεται σε λειτουργία το χρονόμετρο (4.24) και προστίθεται στάγδην διάλυμα υδροξειδίου νατρίου (5.19) με ρυθμό τέτοιο ώστε να διατηρηθεί η τιμή του pH στο 8,3. Αναγιγνώσκεται ο όγκος του διαλύματος αλάλεως που καταναλίσκεται κάθε λεπτό.

Καταγράφονται οι παρατηρήσεις σε μορφή διαγράμματος, χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις χρόνου σαν τετμημένες και τα ml του αλκαλικού διαλύματος, που απαιτούνται για να διατηρηθεί το pH σταθερό, σαν τεταγμένες. Πρέπει να προκύψει μία ευθεία γραμμή.

Το αιώρημα της λιπάσης που αναφέρθηκε ανωτέρω είναι αιώρημα 1 % (M/M) σε νερό. Για κάθε δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται αρκετό από το αιώρημα αυτό έτσι ώστε περίπου 1 ml του αλκαλικού διαλύματος να καταναλώνεται σε 4 με 5 λεπτά. Συνήθως απαιτούνται περίπου 1-5 mg της σκόνης.

Σαν μονάδα λιπάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που θα ελευθερώσει 10 μ-ισοδύναμα οξέος ανά λεπτό. Μετά η ενεργότητα A της χρησιμοποιηθείσης σκόνης, εκφρασμένη σε μονάδες λιπάσης ανά mg, δίνεται από τη σχέση:

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

όπου V είναι ο όγκος του διαλύματος υδροξειδίου νατρίου (5.19) που καταναλώνεται ανά λεπτό, υπολογιζόμενος από το διάγραμμα, m είναι η μάζα, σε mg, της δοκιμαστικής δόσης της σκόνης.

2. Παρασκευή της λιπάσης

Λιπάσες με ικανοποιητική ενεργότητα λιπάσης διατίθενται στο εμπόριο. Αλλά είναι επίσης δυνατό να παρασκευαστούν εργαστηριακά ως εξής:

Ψύχονται 5 kg νεπού παγκρέατος χοίρου στους 0 °C· απομακρύνεται το περιβάλλον στερεό λίπος και συνδετικός ιστός και

▼B

ακολουθεί ομογενοποίηση σε ομογενοποιητή ώστε να αποκτηθεί ένα ιξώδες υγρό (πάστα). Η πάστα αυτή αναδεύεται με τον αναδευτήρα (4.25) επί 4-6 ώρες με 2,5 l άνυδρης ακετόνης και φυγοκεντρείται. Το υπόλειμμα εκχυλίζεται τρεις φορές ακόμα με τον (δίο όγκο ακετόνης, μετά δύο φορές με μείγμα I/I (V/V) ακετόνης και διαιθυλικού αιθέρα, και δύο φορές με διαιθυλικό αιθέρα.

Το υπόλειμμα ξηραίνεται υπό κενό επί 48 ώρες έως ότου αποκτηθεί μία σταθερή σκόνη, που πρέπει να διατηρείται σε ψυγείο.

3. Σε κάθε περίπτωση, συνίσταται να προσδιοριστεί η σύσταση των ολικών λιπαρών οξέων του ίδιου δείγματος, αφού η σύγκριση με αυτή των οξέων στη 2-θέση θα βοηθήσει στην ερμηνεία των λαμβανομένων στοιχείων.
4. Η θερμοκρασία της υδρόλυσης τίθεται στους 37 °C, καθώς χρησιμοποιείται ένα υγρό έλαιο. Ωστόσο, τίθεται στους 40 °C για το δείγμα προς ανάλυση, ώστε να επιτρέψει την εξέταση λιπών με σημεία ζέσης μέχρι 45 °C.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

▼C1

Προσδιορισμός της συνθέσεως των τριγλυκεριδίων σε υγρά φυτικά έλαια εκπεφρασμένης σε ισοδύναμο αριθμό ατόμων άνθρακος. Το παρόν κείμενο περιγράφει μέθοδο ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της συνθέσεως των τριγλυκεριδίων φυτικών ελαίων συναρτήσει του μοριακού βάρους και του βαθμού ακορεστότητας αυτών, εκπεφρασμένου ως ισοδύναμο αριθμό ατόμων άνθρακος.

▼B

2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος αυτή είναι εφαρμόσιμη σε όλα τα φυτικά έλαια που περιέχουν τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων μακρίας αλύσου. Η μέθοδος είναι ειδικά εφαρμόσιμη στην ανίχνευση της παρουσίας μικρών ποσοτήτων ►C1 ημιξηραιομένων ◄ ελαίων (πλούσιων σε λινελαϊκό οξύ) σε φυτικά έλαια που περιέχουν ελαϊκό οξύ σαν το κυρίως ακόρεστο λιπαρό οξύ, όπως το ελαιόλαδο.

3. ΑΡΧΗ

Διαχωρισμός των τριγλυκεριδίων ανάλογα με τον ισοδύναμο αριθμό ατόμων άνθρακα αυτών, με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (πολικότητας ανάστροφης φάσης) και ερμηνεία των χρωματογραφημάτων.

4. ΟΡΓΑΝΑ

- 4.1. Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης, με θερμοστατικό έλεγχο της θερμοκρασίας της στήλης.
- 4.2. Σύριγγα των 10 ml.
- 4.3. Ανιχνευτής: διαφορικό διαθλασίμετρο. Η ευαισθησία πλήρους κλίμακας πρέπει να είναι τουλάχιστον 10^{-4} μονάδες δείκτη διάθλασης.
- 4.4. Στήλη: Στήλη από ανοξειδωτο ατσάλι μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,5 mm, γεμισμένη με σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου με 22-23 % άνθρακα σε μορφή οκταδεκυλσιλανίου, διαμέτρου 5 mm (σημείωση 2).
- 4.5. Καταγραφέας ή/και ολοκληρωτής.

5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικού βαθμού. Οι διαλύτες έκλουσης πρέπει να είναι ►C1 απηλλαγμένοι οξυγόνο ◄, ώστε να μπορούν να ανακυκλωθούν αρκετές φορές χωρίς επίδραση στους διαχωρισμούς.

- 5.1. Χλωροφόρμιο.
- 5.2. Ακετόνη.
- 5.3. Ακετονιτρίλιο.
- 5.4. Διαλύτης έκλουσης: ακετονιτρίλιο + ακετόνη (οι αναλογίες προσαρμόζονται προς απόκτηση του επιθυμητού διαχωρισμού· αρχή με μείγμα 50:50).
- 5.5. Διαλύτης διαλυτοποίησης: ακετόνη ή μείγμα (1:1) ακετόνης-χλωροφόρμιο.
- 5.6. Τριγλυκερίδια αναφοράς: είτε μπορούν να χρησιμοποιηθούν τριγλυκερίδια του εμπορίου (τριπαλμιτίνη, τριολεΐνη κ.λπ.) και οι χρόνοι κατακράτησης αυτών να σχεδιαστούν σε διάγραμμα αντιστοιχίας με τον ισοδύναμο αριθμό άνθρακα, ή, εναλλακτικά, ένα χρωματογράφημα αναφοράς από έλαιο σόγιας (βλέπε σημειώσεις 3 και 4 και σχήματα 1 και 2).

▼ **B**

6. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ένα διάλυμα 5 % των δειγμάτων προς ανάλυση παρασκευάζεται ζυγίζοντας $0,5 \pm 0,001$ g του δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και συμπληρώνεται έως τα 10 ml με το διαλύτη διαλυτοποίησης (5.5).

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ

- 7.1. Τίθεται σε λειτουργία το χρωματογραφικό σύστημα. Ο διαλύτης έκλουσης (5.4) αντλείται με ρυθμό 1,5 ml/mm για να καθαριστεί ολόκληρο το σύστημα. Αναμένουμε μέχρις ότου μία σταθερή γραμμή βάσης αποκτηθεί.

Ενίονται 10 ml του δείγματος παρασκευασμένου κατά την 6.

8. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Χρησιμοποιείται η μέθοδος με εσωτερικό πρότυπο, δηλαδή υποτίθεται ότι το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών που αντιστοιχούν στα διάφορα τριγλυκερίδια ισούται με το 100 %. Η σχετική ποσοστιαία περιεκτικότητα κάθε τριγλυκεριδίου υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

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

με το αποτέλεσμα να δίνεται με ένα δεκαδικό.

Σημείωση 1: Η σειρά έκλουσης μπορεί να προσδιοριστεί υπολογίζοντας τους ισοδύναμους αριθμούς άνθρακα, συχνά καθοριζόμενους από τη σχέση $ECN = CN - 2\eta$, όπου CN είναι ο αριθμός άνθρακα και η είναι ο αριθμός των διπλών δεσμών· μπορεί να υπολογιστεί με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια λαμβάνοντας υπόψη την προέλευση των διπλών δεσμών. Εάν η_o , η_1 και $\eta_{1\eta}$ είναι οι αριθμοί των διπλών δεσμών που αποδίδονται στο ελαϊκό, λινελεϊκό και λινολενικό οξύ αντίστοιχα, ο ισοδύναμος αριθμός άνθρακα μπορεί να υπολογιστεί μέσα από μία σχέση της μορφής:

$$ECN = CN - d_o\eta_o - d_1\eta_1 - d_{1\eta}\eta_{1\eta},$$

όπου οι συντελεστές d_o , d_1 και $d_{1\eta}$ μπορούν να υπολογιστούν με χρήση των τριγλυκεριδίων αναφοράς. Κάτω από τις συνθήκες που καθορίζονται σε αυτή τη μέθοδο, η λαμβανόμενη σχέση θα είναι περίπου:

$$ECN = CN - (2,60 \eta_o) - (2,35 \eta_1) - (2,17 \eta_{1\eta})$$

Σημείωση 2: Παραδείγματα: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333·

Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art 50377 η παρόμοια,

Σημείωση 3: Με αρκετά τριγλυκερίδια αναφοράς είναι επίσης δυνατό να υπολογιστεί η διακριτική ικανότητα αναφορικά με τη τριελαϊνη,

$$a = RT'/RT'_{\text{ολεινης}}$$

χρησιμοποιώντας τον ανηγμένο χρόνο κατακράτησης $RT' = RT - RT_{\text{διαλύτη}}$

Το διάγραμμα των τιμών του $\log a$ σε συνάρτηση του f (αριθμός διπλών δεσμών) επιτρέπει τον προσδιορισμό των τιμών κατακράτησης για όλα τα τριγλυκερίδια των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα τριγλυκερίδια αναφοράς (βλέπε σχήμα 2).

Σημείωση 4: Η αποτελεσματικότητα της στήλης πρέπει να επιτρέπει σαφή διαχωρισμό της κορυφής της τριλινολεϊνης από της κορυφές των τριγλυκεριδίων με συνεχόμενο RT.

▼ **M11**

Σημείωση 5: Σε ότι αφορά τα διανγή παρθένα έλαια και τα ακατέργαστα πυρηνέλαια, για να ληφθεί σαφής διαχωρισμός της κορυφής της τριλινολεϊνης από τις γειτονικές κορυφές ή από ενδεχόμενες ουσίες που παρεμβάλλονται, είναι απαραίτητο να καθαρίζονται προληπτικά τα έλαια, σύμφωνα με την ακόλουθη μεθοδολογία:

▼ **M11**

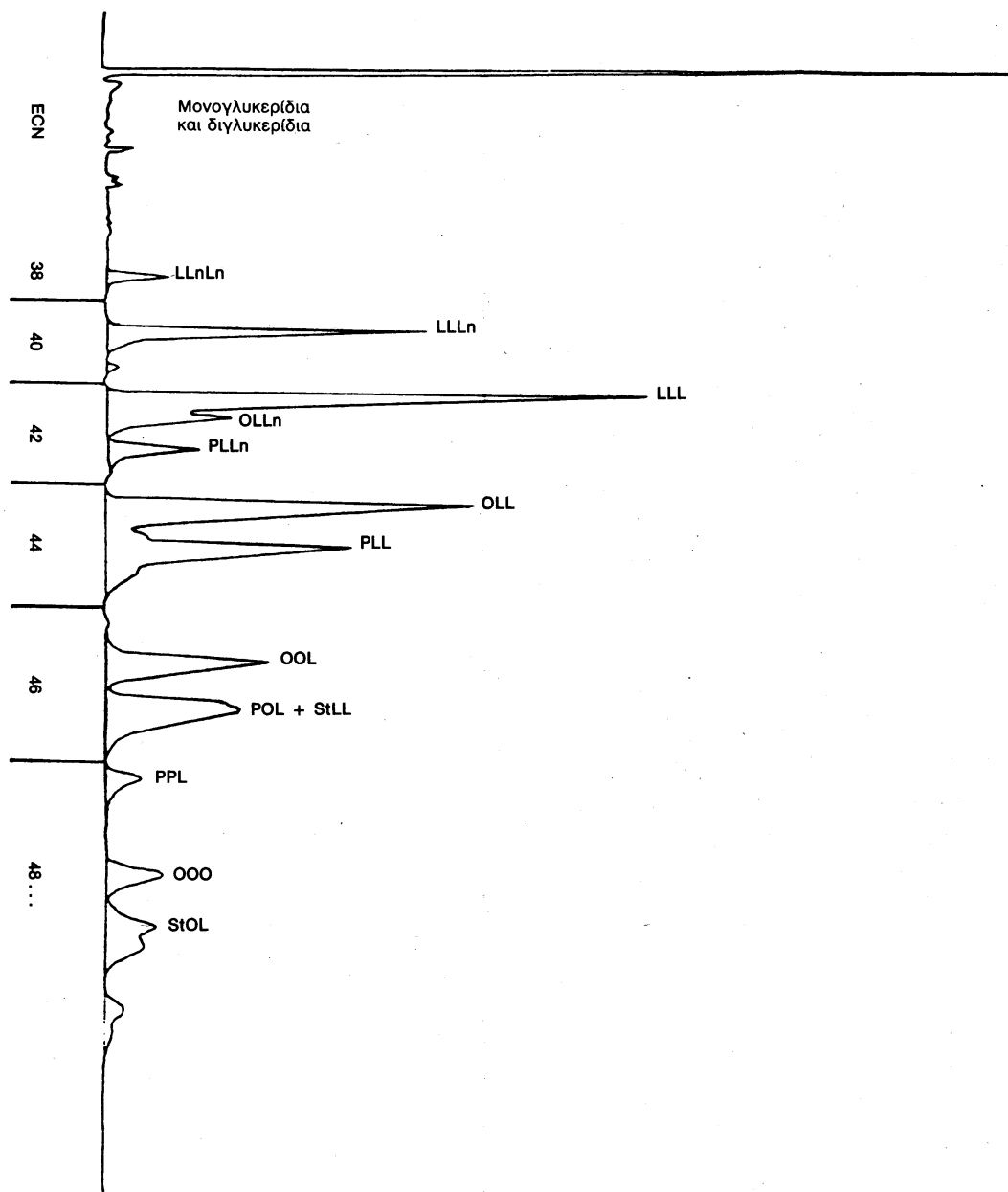
Αφήνονται να απορροφηθούν 200 ml ελαιολάδου, χωρίς να αραιωθούν, σε λεπτή στήλη διοξειδίου του πυριτίου για χρωματογραφία υγρού-στερεού (τύπου SEP PAK silica cartridge-waters αριθ. 51900).

Τα τριγλυκερίδια εκλύονται με 20 ml άνυδρου εξαίνιου υψηλής αποδόσεως υγρή χρωματογραφία (YAYX), σε μέγιστο χρονικό διάστημα 20 δευτερολέπτων.

Το προϊόν της έκλυσης ξηραίνεται σε ρεύμα αζώτου και παραλαμβάνει σε ισιπροπανόλη ή ακετόνη (5 ml). Εκχέονται 10-20 ml σε YAYX. Πρέπει να ελέγχεται η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα ώστε να είναι η ίδια πριν και μετά τον καθορισμό, εντός του περιθωρίου σφάλματος της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.

▼ **B****Σχήμα 1**

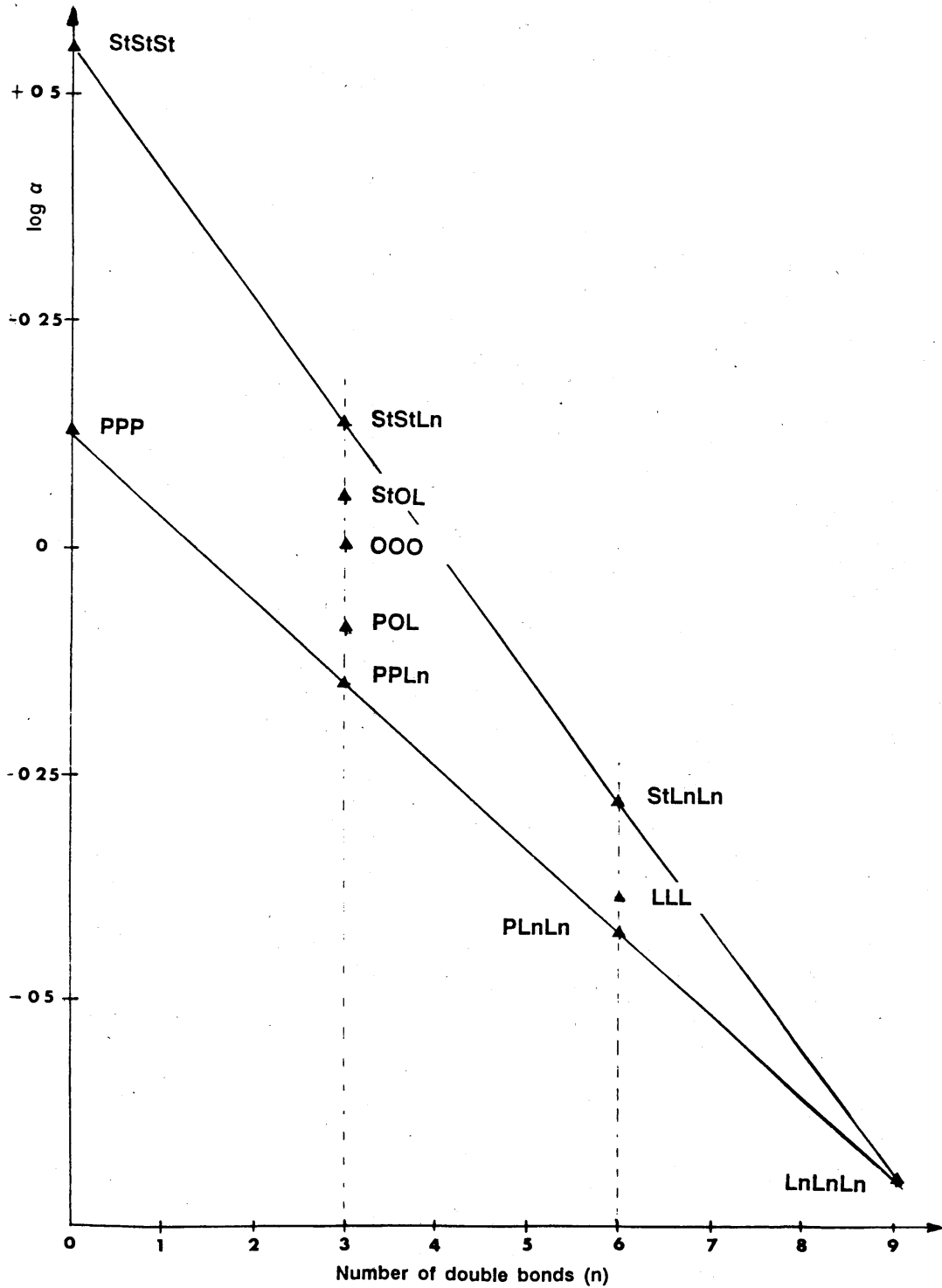
Χρωματογράφημα δείγματος σογιέλαιου



Σχήμα: P = Palmitinsäure; St = Stearinsäure; O = Ölsäure; L = Linolsäure; Ln = Linolensäure.

▼B

Σχήμα 2

Διάγραμμα του $\log a$ σε συνάρτηση του f (αριθμός διπλών δεσμών)

Σχίσμα: La = Laurinsäure; My = Myristinsäure; P = Palmitinsäure; St = Stearinsäure; O = Ölsäure; L = Linolsäure; Ln = Linolensäure.

▼ **B**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΧ

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ► **C1** ΑΝΑΛΥΣΗ ◄ ΣΤΟ ΥΠΕΡΙΩΔΕΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φασματοφωτομετρική εξέταση στο υπεριώδες μπορεί να δώσει ► **C1** πληροφορίες ◄ ως προς την ποιότητα ενός λίπους, την κατάσταση συντήρησής του και τις μεταβολές που έχουν επέλθει ► **C1** τις οφειλόμενες σε τεχνολογικές διαδικασίες ◄.

Η απορρόφηση στα μήκη κύματος που καθορίζονται στη μέθοδο οφείλεται στη παρουσία ► **C1** συζυγιακών συστημάτων ◄ διένιων και τριένιων. Οι απορροφήσεις αυτές εκφράζονται ως ειδικές αποσβέσεις $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 1 % (η απόσβεση διαλύματος 1 % του λίπους στον ορισμένο διαλύτη, σε πάχος 1 cm) συμβατικά παριστώμενες με K (που ονομάζεται επίσης συντελεστής αποσβέσεως).

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Η μέθοδος περιγράφει τη διαδικασία εκτέλεσης φασματοφωτομετρικής εξέτασης λιπών στο υπεριώδες.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το υπό εξέταση λίπος διαλύεται στον απαιτούμενο διαλύτη και μετά προσδιορίζεται η απόσβεση του διαλύματος στα καθοριζόμενα μήκη κύματος αναφορικά προς καθαρό διαλύτη. Οι ειδικές αποσβέσεις υπολογίζονται από τις φασματοφωτομετρικές αναγνώσεις.

3. ΟΡΓΑΝΑ

- 3.1. Φασματοφωτόμετρο προς μέτρηση αποσβέσεων στο υπεριώδες μεταξύ 220 και 360 nm, με δυνατότητα ανάγνωσης αυτόνομων νανομετρικών μονάδων.
- 3.2. Ορθογώνιες κυψελίδες από χαλαζία, με καλύμματα, οπτικού μήκους 1 cm. Όταν είναι γεμάτες με νερό ή άλλο κατάλληλο διαλύτη, οι κυψελίδες δεν πρέπει να εμφανίζουν διαφορά μεταξύ τους μεγαλύτερη από 0,01 μονάδες απόσβεσης.
- 3.3. Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml.

▼ **M6**

- 3.4. Χρωματογραφική στήλη της οποίας το επάνω μέρος έχει μήκος 270 mm και διάμετρο 35 mm και το κάτω μέρος μήκος 270 mm και διάμετρο 10 mm.

▼ **B**

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 4.1. — Φασματοφωτομετρικά καθαρό ισοοκτάνιο (2,2,4-τριμεθυλοπεντάνιο). Αναφορικά προς απεσταγμένο νερό, αυτό δεν πρέπει να έχει διαπερατότητα μικρότερη από 60 % στα 220 nm και μικρότερη από 95 % στα 250 nm,
ή
— φασματοφωτομετρικά καθαρό κυκλοεξάνιο: αναφορικά προς απεσταγμένο νερό, αυτό δεν πρέπει να έχει διαπερατότητα μικρότερη από 40 % στα 220 nm και μικρότερη από 95 % στα 250 nm.

▼ **M6**▼ **B**

- 4.2. Βασική αλουμίνα για χρωματογραφία στήλης, προετοιμασμένη και ελεγμένη όπως περιγράφεται στο παράρτημα I.
- 4.3. η-εξάνιο, για χρωματογραφία.
5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
- 5.1. Το υπό εξέταση δείγμα πρέπει να είναι εντελώς ομοιογενές και χωρίς υποψία ακαθαρσιών. Έλαια τα οποία είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πρέπει να διηθηθούν ► **C1** μέσω διηθητικού χάρτη ◄ σε θερμοκρασία περίπου 30 °C, σκληρά λίπη πρέπει να

▼B

ομοιογενοποιηθούν και να διηθηθούν σε θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη από 10 °C πάνω από το σημείο τήξης.

- 5.2. Ζυγίζονται με σχετική ακρίβεια 0,25 g του δείγματος που προετοιμάστηκε με τον τρόπο αυτό σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml, ο όγκος συμπληρώνεται έως τη χαραγή με το καθοριζόμενο διαλύτη και ομοιογενοποιείται. Το διάλυμα που προκύπτει πρέπει να είναι εντελώς διαυγές. Αν υπάρχει αδιαφάνεια ή θολότητα διηθείται γρήγορα ►C1 μέσω διηθητικού χάρτη ◄1.

- 5.3. Γεμίζεται μία κυψελίδα με το αποκτηθέν διάλυμα και μετρώνται οι απορροφήσεις σε κατάλληλο μήκος κύματος μεταξύ 232 και 276 nm, λαμβάνοντας το χρησιμοποιούμενο διαλύτη ως αναφορά.

Οι καταγραφόμενες τιμές απόσβεσης πρέπει να βρίσκονται μέσα στη περιοχή 0,1-0,8. Εάν όχι, οι μετρήσεις πρέπει να επαναληφθούν, χρησιμοποιώντας, κατά περίπτωση, πυκνότερα ή αραιότερα διαλύματα.

- 5.4. Όταν απαιτείται ένας προσδιορισμός ειδικής απόσβεσης μετά από ►C1 διέλευση από αλουμίνα ◄1, εκτελείται ως εξής: Τοποθετούνται 30 g βασικής αλουμίνας σε αιώρημα, σε εξάνιο, μέσα στη χρωματογραφική στήλη. Αφού το απορροφητικό κατακαθίσει, απομακρύνεται το πλεονάζον εξάνιο έως 1 cm περίπου πάνω από την κορυφή της αλουμίνας.

Διαλύονται 10 g του λίπους, ομοιογενοποιημένου και διηθέντος όπως περιγράφηκε στην 5.1, σε 100 ml εξάνιου και το διάλυμα εκχύεται μέσα στη στήλη. Το έκλουσμα συλλέγεται και απομακρύνεται όλος ο διαλύτης υπό κενό σε θερμοκρασία κάτω από 25 °C.

Χρησιμοποιώντας το λίπος που αποκτήθηκε με το τρόπο αυτό, προχωρούμε αμέσως όπως καθορίστηκε στην 5.2.

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- 6.1. Καταγράφονται οι ειδικές αποσβέσεις (συντελεστές αποσβέσεως) στα διάφορα μήκη κύματος, υπολογιζόμενες ως εξής:

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

όπου:

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

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

c = συγκέντρωση του διαλύματος σε g/100 ml,

s = πάχος της κυψελίδας σε cm.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία.

- 6.2. Η φασματοφωτομετρική ανάλυση ελαιόλαδου σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο των κανονισμών της ΕΟΚ καθορίζει τον προσδιορισμό της ειδικής απόσβεσης σε διάλυμα ισοοκτάνιου σε μήκη κύματος 232 και 270 nm και τον προσδιορισμό ΔK , ο οποίος αποδίδεται ως:

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

όπου K_m είναι η ειδική απόσβεση σε μήκος κύματος m , το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης γύρω από τα 270 nm.

▼B*ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι**Προετοιμασία της αλουμίνας και έλεγχος της ενεργότητάς της*

A1.1. Προετοιμασία της αλουμίνας

Αλουμίνα, ►C1 αλουμίνα προξηρανθείσα ◄ σε φούρνο στους 380-400 °C επί 3 ώρες, τοποθετείται σε ερμητικά κλεισμένο δοχείο, προστίθεται απεσταγμένο νερό σε αναλογία 5 ml ανά 100 g αλουμίνας, το δοχείο κλείνεται αμέσως, ανακινείται επανειλημμένα και μετά αφήνεται όπως έχει επί τουλάχιστον 12 ώρες πριν από τη χρήση.

A1.2. Έλεγχος της ενεργότητας της αλουμίνας

Προετοιμάζεται χρωματογραφική στήλη με 30 g αλουμίνας. Ενεργώντας όπως περιγράφεται στον παράγραφο 5.4, διοχετεύεται μείγμα αποτελούμενο από:

— 95 % παρθένο ελαιόλαδο με ειδική απόσβεση μικρότερη από 0,18 στα 268 nm,

▼C1

— 5 % αραχιδέλαιο επεξεργασμένο σε αποχρωστικές γαίες, κατά τον εξευγενισμό του και να έχει ειδική απόσβεση στα 268 nm ανωτέρα ή ίση του 4.

▼B

Εάν μετά από διέλευση μέσα από τη στήλη το μείγμα έχει ειδική απόσβεση μεγαλύτερη από 0,11 στα 268 nm, η αλουμίνα είναι αποδεκτή, εάν όχι, πρέπει να αυξηθεί το επίπεδο ►C1 ενυδατώσεως ◄.

*ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ**Ρύθμιση του φασματοφωτόμετρου*

- A2. Ο εξοπλισμός πρέπει να ελέγχεται κατά διαστήματα (τουλάχιστον κάθε 6 μήνες) για την ανταπόκριση στα μήκη κύματος και για την ακρίβεια της ανταπόκρισης.
- A2.1. Το μήκος κύματος μπορεί να ελεγχθεί χρησιμοποιώντας λυχνία ατμών υδραργύρου ή με κατάλληλα φίλτρα.
- A2.2. Για να ελεγχθεί η ανταπόκριση του φωτοκύτταρου και του φωτοπολλαπλασιαστή, εκτελούνται τα ακόλουθα: ζυγίζονται 0,2 g καθαρού χρωμικού καλίου για φασματοφωτομετρία, διαλύονται σε διάλυμα 0,05 N υδροξειδίου του καλίου σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml και ο όγκος συμπληρώνεται έως τη χαραγή. Λαμβάνονται ακριβώς 25 ml από το αποκτηθέν διάλυμα, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml και αραιώνονται, με συμπλήρωση του όγκου έως τη χαραγή, χρησιμοποιώντας το ίδιο διάλυμα υδροξειδίου του καλίου.

Μετράται η απόσβεση του διαλύματος που αποκτήθηκε με τον τρόπο αυτό στα 275 nm, χρησιμοποιώντας το διάλυμα υδροξειδίου του καλίου ως αναφορά. Η μετρηθείσα απόσβεση χρησιμοποιώντας κυψελίδα του 1 cm πρέπει να είναι $0,2 \pm 0,005$.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ X «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 XB.

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 μεθυλεστέρες λιπών γνωστής σύστασης, κατά προτίμηση ανάλογης με τη σύσταση της προς ανάλυση λιπαρής ύλης.

Λαμβάνεται πρόνοια ώστε να παρεμποδιστεί η οξειδωση 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 στηλών 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).

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

▼B

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 διοξειδίο 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 σίλιανοποίηση 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 βουτανοδιόλη, ►C1 πολυαδιπική ◄ 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 διοξειδίο 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.

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

Σημείωση 4: 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 ◄.

▼B

- 3.1.4.3. Συναρμολόγηση και προετοιμασία (κοντισιονάρισμα) της στήλης. Κατά τη συναρμολόγηση των τριχοειδών στηλών τηρούνται οι συνήθεις 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 χάρη 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 5: 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.

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·

▼B

ζ) 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

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 χάρη 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, έσπε 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:

▼B

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

ενώ η διακριτική ικανότητα, R με τον τύπο:

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

όπου:

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

$\omega_{(I)}$ και $\omega_{(II)}$ = είναι τα πλάτη, σε χιλιοστάμετρα, 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 χιλιοστάμετρα, 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:

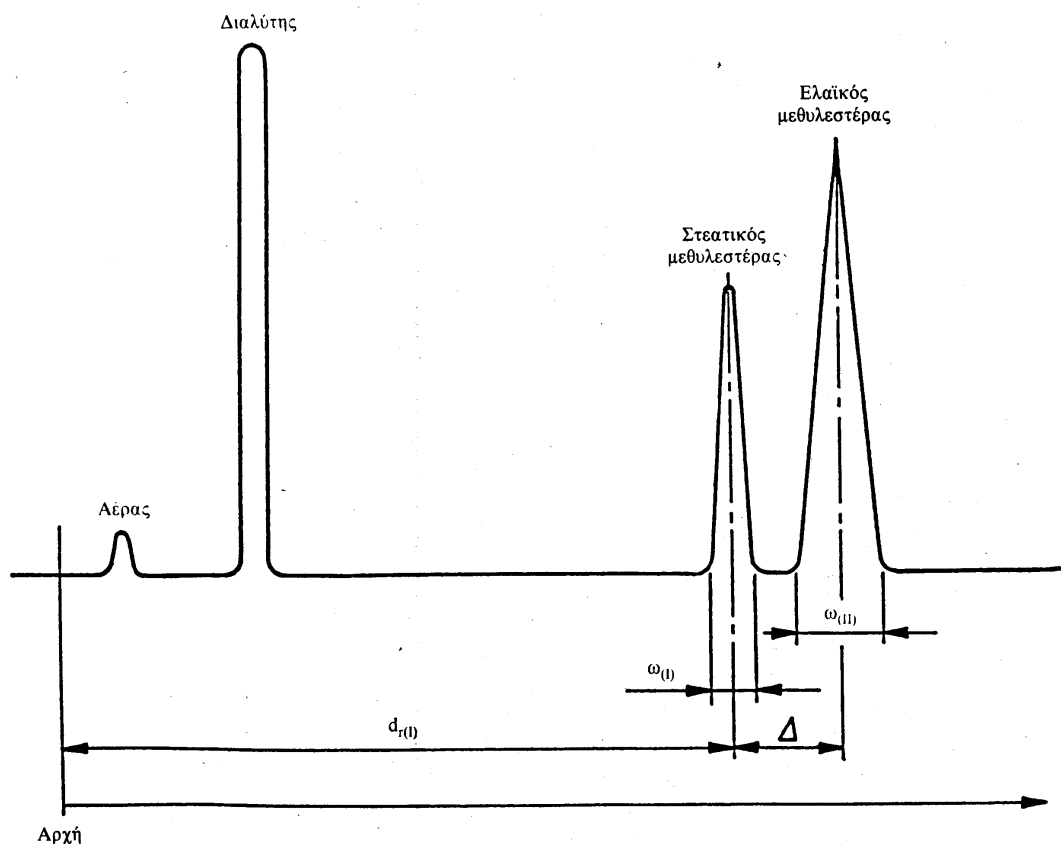
a = είναι το ύψος της χαμηλότερης κορυφής, μετρούμενο ως προς τη γραμμή βάσεως και

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

▼B

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.

▼B

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να γίνει συνδυασμός των δύο τεχνικών.

Μετά τη θέρμανση με προγραμματισμό θερμοκρασίας, συνεχίζεται η έκλυση 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 χάρι 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 το αποτελούν. Για κάθε βαθμό ακορέστου, σχεδιάζονται σε ημιλογαριθμικό 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 αλυσίδα 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 έκλυση).

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,

▼B

►C1 ΣΑ ◀ = είναι το άθροισμα των εμβαδών που περι-
κλείονται από όλες τις κορυφές.

Το αποτέλεσμα δίδεται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

Σημείωση 6: Στη γενική αυτή περίπτωση, θεωρείται ότι το αποτέ-
λεσμα του υπολογισμού βάσει των σχετικών
εμβαδών αντιπροσωπεύει εκατοστιαία αναλογία
κατά μάζα. Για τις περιπτώσεις όπου η υπόθεση
αυτή δεν ευσταθεί, βλ. σημείο 5.2.2.2.

5.2.2.2. Χρήση συντελεστών διορθώσεως

Σε ορισμένες περιπτώσεις, παραδείγματος χάρη παρουσία
λιπαρών οξέων με λιγότερα από 8 άτομα άνθρακα ή οξέων με
δευτερεύουσες ομάδες, όταν χρησιμοποιούνται ανιχνευτές
θερμικής αγωγιμότητας ή όταν απαιτείται οπωσδήποτε η μεγαλύ-
τερη 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 χρωμα-
τογραφήματος που προκύπτει από την ανάλυση μείγματος
μεθυλεστέρων γνωστής σύστασης η οποία εκτελείται με πανο-
μοιότυπες 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), υπολογί-
ζεται 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 χάρη 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 $K_{C_{16}}$),

K'_s = είναι ο συντελεστής διορθώσεως για το εσωτερικό πρότυπο (σχετικός, ως προς τον $K_{C_{16}}$),

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 κυανοπροπυλσικλικόνης πάχους μεταξύ 0,1 και 0,3 μm (τύπου SP 2340, τύπου SP 2380, C.P.sil 88, Silor 10 και άλλων παρομοίων).
- 6.2. Οι μεθυλεστέρες παρασκευάζονται σύμφωνα με τη μέθοδο B του άλλου παραρτήματος (X/B). Οι λιπαρές ουσίες των οποίων η περιεκτικότητα σε ελεύθερα οξέα υπερβαίνει το 3 % πρέπει να εξουδετερώνονται προληπτικά σύμφωνα με το σημείο 6.1. του παραρτήματος 7.
- 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),
 - 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 μέρους 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).

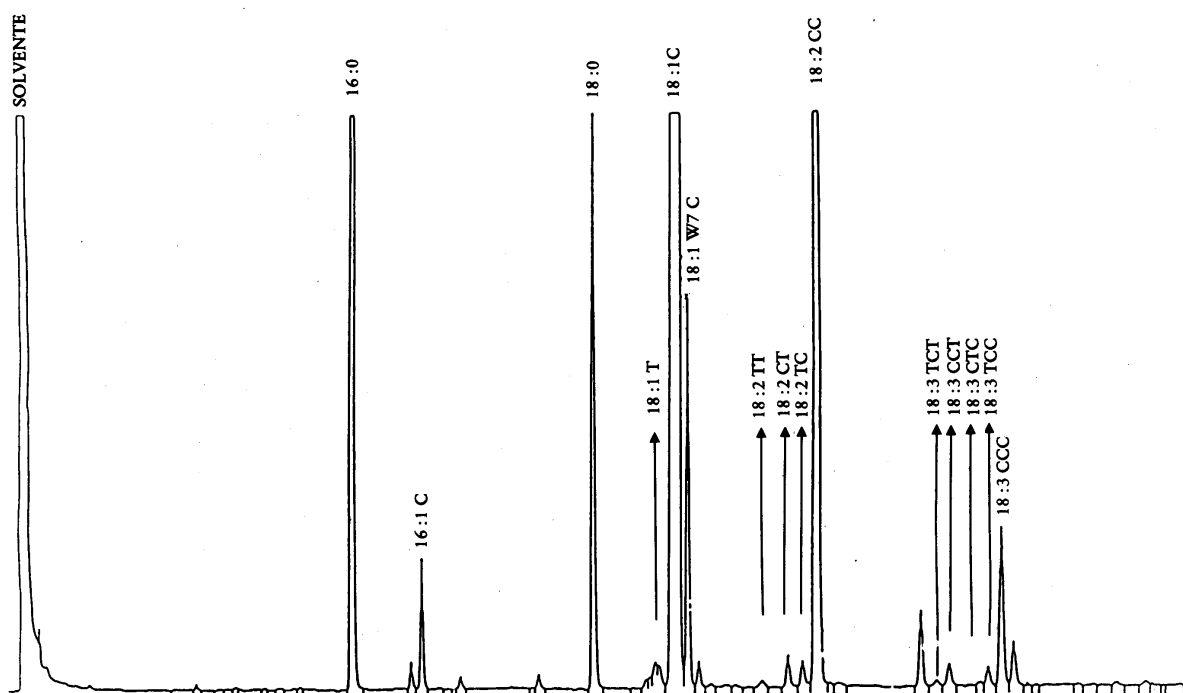
▼ M2

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

▼ M2

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.

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

▼ B

► M2 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.

▼ **B**

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 εγχεόμενου δείγματος δοκιμής	Συνήθως μεταξύ 0,5 μl και 2 μl

► **M2** 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 πυρηνελαίων 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.

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

▼ **M19**

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 HPLC 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 (χωρητικότητας 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 διαυγές. 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.

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).

▼ **M19**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),
- φαινολοφθαλεΐνη, 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 φαινολοφθαλεΐνης. 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 ζωνρά 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 B πρέπει να γίνεται σε απαγωγό.

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 I).

Εξάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας.

Σημείωση 1: Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διαλύματα υδροχλωρίου σε μεθανόλη του εμπορίου. Στο εργαστήριο, είναι εύκολο να παρασκευαστούν μικρές

▼ **M19**

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 σκότος 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 εξάνιου.
- Φυγοκεντρούμε και η εξανική φάση απομακρύνεται, έτοιμη προς χρήση.

2.6.2. Μέθοδος A

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 αεροψυκτήρα μήκους περίπου 1 m, εφοδιασμένο με εσφυρισμένη άρθρωση.
- Βαθμονομημένο σιφώνιο 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 υδρόλουτρου περιορίζεται στους 90 °C.

▼ **M19**3. **Παράμετροι ακριβείας**

Η στατιστική αξιολόγηση της ακριβείας 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.

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).

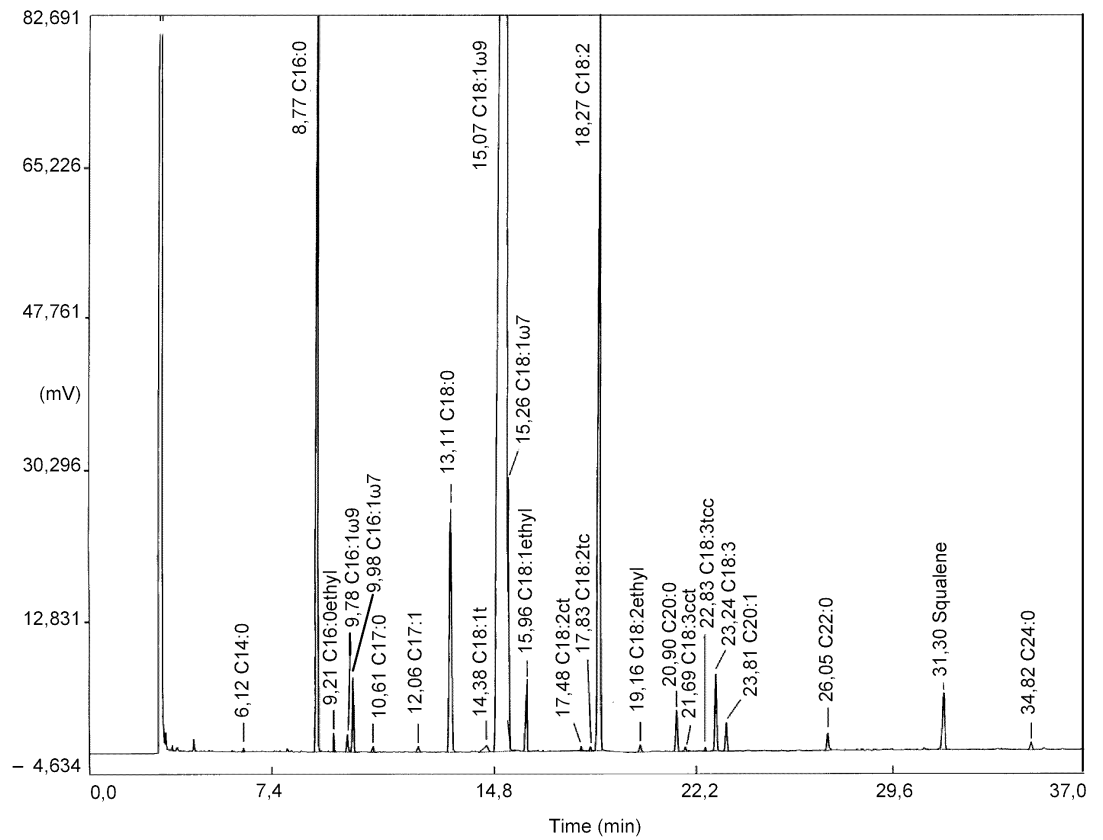
Το σκουαλένιο δεν λαμβάνεται υπόψη στον υπολογισμό του συνολικού εμβαδού.

- 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 πηρηγελαίου, ληφθέν με τη μέθοδο της μεθυλίωσης εν ψυχρά. Οι χρωματογραφικές κορυφές αντιστοιχούν στους μεθυλεστέρες, εκτός αν υποδεικνύεται διαφορετικά



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XI

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ►C1 ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ◄ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟ-
ΛΑΛΟΥ 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 πόμα 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.

▼ **M19***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΧΙΙ***ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ****1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Η παρούσα μέθοδος έχει σκοπό τη θέσπιση των αναγκαίων κριτηρίων για την αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παρθένων ελαιολάδων κατά την έννοια του σημείου 1 του παραρτήματος του κανονισμού 136/66/ΕΟΚ και την περιγραφή της σχετικής μεθόδου ταξινόμησής τους.

Η παρούσα μέθοδος εφαρμόζεται μόνο για την ταξινόμηση των παρθένων ελαιολάδων, βάσει της ύπαρξης του φρουτώδους γεύσεως και της έντασης των ελαττωμάτων τους, κατά την κρίση ομάδας επιλεγμένων και εκπαιδευμένων δοκιμαστών, συγκροτημένων σε ομάδα, σύμφωνα με το σημείο 4.

2. ΓΕΝΙΚΑ

Για το γενικό βασικό λεξιλόγιο, η αίθουσα δοκιμών, η γενική μεθοδολογία καθώς και το ποτήρι δοκιμής των ελαίων συνιστάται να είναι σύμφωνα με τις προδιαγραφές που προβλέπονται από το διεθνές συμβούλιο ελαιολάδου.

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

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

Πικρό: χαρακτηριστική γεύση ελαιολάδου που έχει ληφθεί από πράσινες ελιές ή από ελιές που αρχίζει να αλλάζει το χρώμα τους.

Πικάντικο: έντονη κιναισθητική αίσθηση, χαρακτηριστική ελαίων που παράγονται στην αρχή της ελαιοκομικής περιόδου, κυρίως από πράσινες ακόμη ελιές.

3.2. Αρνητικά χαρακτηριστικά

Ατροχάδο: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που έχει παραληφθεί από ελιές αποθηκευμένες σε σωρούς και που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο αναερόβιας ζύμωσης.

Μουχλιασμένο — νοτισμένο: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδων που έχουν παραληφθεί από ελιές προσβεβλημένες από μύκητες και ζυμομύκητες λόγω αποθήκευσης των καρπών για πολλές ημέρες σε περιβάλλον με υγρασία.

Μούργα: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που έχει παραμείνει σε επαφή με το ίζημα που καθιζάνει σε βαρέλια και δεξαμενές φύλαξης.

Κρασώδες — οξώδες: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδων που θυμίζουν κρασί ή ξύδι. Οφείλεται, βασικά, σε διαδικασία ζύμωσης στις ελιές που οδηγεί στο σχηματισμό οξικού οξέος, οξικού αιθυλεστέρα και αιθανόλης.

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

Ταγγό: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδων που έχουν υποστεί διαδικασία οξείδωσης.

Ψημένο ή καμένο: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που προήλθε από υπερβολική ή/και παρατεταμένη θέρμανση κατά την παραλαβή του και, ιδιαίτερα, κατά τη θερμομάλαξη της ελαιόπαστας, όταν αυτή πραγματοποιηθεί σε ακατάλληλες θερμοκτικές συνθήκες.

Άχρωο — ζύλο: χαρακτηριστική οσμή-γεύση ορισμένων ελαιολάδων που προέρχονται από ελιές που έχουν αφυδατωθεί.

▼ **M19**

Τραχύ: χαρακτηριστική πηχτή και ζυμώδης αίσθηση που παράγεται στο στόμα από ορισμένα έλαια.

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

Απόνερα: οσμή-γεύση ελαιολάδου που αποκτάται από το ελαιόλαδο ύστερα από παρατεταμένη επαφή τους με απόνερα του ελαιοτριβείου.

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

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

Χωματίλα: οσμή-γεύση ελαιολάδου προερχόμενο από ελιές που έχουν συλλεγεί μαζί με χώμα ή λάσπες και δεν έχουν πλυθεί.

Σκουλήκι: οσμή-γεύση ελαιολάδου που παραλαμβάνεται από ελιές που έχουν υποστεί σοβαρή προσβολή από νύμφες δάκου της ελαίας (*Bactrocera oleae*).

Αγγούρι: Οσμή-γεύση ελαιολάδου που παράγεται όταν το ελαιόλαδο είναι συσκευασμένο σε ερμητικά κλειστά δοχεία για υπερβολικό χρονικό διάστημα και ειδικά σε λευκοσιδηρά δοχεία, και η οποία αποδίδεται στο σχηματισμό 2,6-εννεανοδιενάλης.

4. ΟΜΑΔΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η ομάδα ορίζεται από το κράτος μέλος και αποτελείται από τον επικεφαλής της ομάδας και από οκτώ έως δώδεκα δοκιμαστές. Ωστόσο, για την περίοδο 2001-2002 οι δοκιμαστές μπορεί να είναι λιγότεροι από οκτώ.

Ο επικεφαλής της ομάδας πρέπει να είναι εξαιρετικά καταρτισμένος, γνώστης και με ιδιαίτερη εμπειρία στους διάφορους τύπους ελαίων. 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 για την εκπαίδευσή τους και τον έλεγχο των επιδόσεών τους, ώστε οι ικανότητές τους να διατηρούνται πάντοτε σε ικανό επίπεδο.

Οι δοκιμαστές για τους οργανοληπτικούς ελέγχους του ελαιολάδου πρέπει να επιλέγονται και να εκπαιδεύονται ανάλογα με την ικανότητά τους στη διάκριση μεταξύ παρομοίων δειγμάτων, σύμφωνα με τον οδηγό του διεθνούς συμβουλίου ελαιολάδου για την επιλογή, την εκπαίδευση και τον έλεγχο των χαρακτηρισμένων ως δοκιμαστών παρθένου ελαιολάδου.

Οι ομάδες οργανοληπτικής εξέτασης πρέπει να συμμετέχουν στις οργανοληπτικές αξιολογήσεις που προβλέπονται σε εθνικό, κοινοτικό ή διεθνές επίπεδο για τον περιοδικό έλεγχο και την εναρμόνιση των κριτηρίων αντίληψης. Εξάλλου, πρέπει να παρέχουν κάθε χρόνο στο συγκεκριμένο κράτος μέλος κάθε πληροφορία σχετικά με τη σύνθεση και τον αριθμό των αξιολογήσεων που πραγματοποιήσαν ως αναγνωρισμένη ομάδα.

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

5.1. Χρησιμοποίηση του φύλλου χαρακτηριστικών από τον δοκιμαστή

Το φύλλο χαρακτηριστικών που χρησιμοποιείται από τον δοκιμαστή εμφανίζεται στο προσάρτημα Α της παρούσας μεθόδου.

Κάθε δοκιμαστής που αποτελεί μέλος της ομάδας πρέπει να οσφραίνεται και στη συνέχεια να γεύεται ⁽¹⁾ το υπό εξέταση έλαιο, το οποίο περιέχεται στο ποτήρι δοκιμής, προκειμένου να αναλύσει τις αντιλήψεις του από πλευράς όσφρησης, γεύσης, αφής και κιναισθησίας. Στη συνέχεια, πρέπει να καταγράφει στο φύλλο χαρακτηριστικών

(1) Όταν παρατηρήσει ορισμένες εξαιρετικά αρνητικές ιδιότητες, μπορεί να απόσχει της πρόγευσης και να σημειώσει στο φύλλο χαρακτηρισμού την εξαιρετική αυτή κατάσταση.

▼ **M19**

που έχει στη διάθεσή του, την ένταση με την οποία αντιλαμβάνεται καθεμία από τις αρνητικές και θετικές ιδιότητες.

Στην περίπτωση όπου γίνουν αντιληπτές αρνητικές ιδιότητες που δεν αναφέρονται στο φύλλο χαρακτηριστικών, αυτές πρέπει να καταγράφονται στο χώρο με το χαρακτηρισμό «άλλες», χρησιμοποιώντας τον ή τους όρους που τις περιγράφουν με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια μεταξύ εκείνων που ορίζονται στο σημείο 3.2 της παρούσας μεθόδου.

5.2. Χρήση των δεδομένων από τον επικεφαλής της ομάδας

Ο επικεφαλής της ομάδας πρέπει να μαζεύει τα φύλλα χαρακτηριστικών που έχουν συμπληρωθεί από τους δοκιμαστές και να ελέγχει τις αποδοθείσες εντάσεις των ιδιοτήτων. Σε περίπτωση εντοπισμού κάποιας ανωμαλίας, ζητά από τον δοκιμαστή να αναθεωρήσει το φύλλο χαρακτηριστικών 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 δέκα στήλες αντιστοιχούσες στις δέκα αισθητηριακές ιδιότητες και η γραμμές αντιστοιχούσες στους η δοκιμαστές της ομάδας.

Όταν κάποια αρνητική ιδιότητα έχει καταγραφεί στη στήλη «άλλες» από το 50 % τουλάχιστον της ομάδας, ο επικεφαλής πρέπει να προβαίνει στον υπολογισμό της διάμεσης τιμής της ιδιότητας αυτής και στην αντίστοιχη κατάταξη.

Σε περίπτωση αναλύσεων που πραγματοποιούνται στο πλαίσιο ελέγχων συμφωνίας με το πρότυπο ή κατ' έφεση εξετάσεων, ο επικεφαλής της ομάδας πρέπει να προβαίνει σε τριπλή οργανοληπτική αξιολόγηση του ελαίου, με μία τουλάχιστον ημέρα διάλειμμα. Η διάμεση τιμή των ιδιοτήτων υπολογίζεται από το σύνολο των δεδομένων των φύλλων χαρακτηριστικών των τριών δοκιμών.

5.3. Κατάταξη των ελαίων

Το έλαιο κατατάσσεται στις ακόλουθες κατηγορίες, ανάλογα με τη διάμεση τιμή των ελαττωμάτων και τη διάμεση τιμή της φρουτώδους ιδιότητας. Με τον όρο διάμεση τιμή των ελαττωμάτων νοείται η διάμεση τιμή της αρνητικής ιδιότητας που γίνεται αντιληπτή με τη μεγαλύτερη ένταση. Η τιμή του ανθεκτικού συντελεστή διακύμανσης για αυτή την αρνητική ιδιότητα πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση με 20 %.

- 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 2,5 και η διάμεση τιμή για το φρουτώδες είναι μεγαλύτερη του 0.
- γ) *Κοινό παρθένο ελαιόλαδο*: η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι μεγαλύτερη του 2,5 και μικρότερη ή ίση του 6,0· ή η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι μικρότερη ή ίση με το 2,5 και η διάμεση τιμή για το φρουτώδες είναι ίση με 0.
- δ) *Λαμπάντε παρθένο ελαιόλαδο*: η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι μεγαλύτερη του 6,0.

Ωστόσο, από την 1η Νοεμβρίου 2003, οι κατηγορίες γ) και δ) αντικαθίστανται από την κατηγορία:

- γ) *Λαμπάντε ελαιόλαδο*: η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι μεγαλύτερη του 2,5· ή η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι μικρότερη ή ίση με 2,5 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 ελαίου.

▼ **M19***ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ Α*

Φύλλο χαρακτηρισμού
(για χρήση από τον δοκιμαστή)

ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΤΩΝ ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΩΝ	ΕΝΤΑΣΗ
Ατροχάδο	—————→
Μουχλιασμένο-νοτισμένο	—————→
Κρασώδες-οξώδες	—————→
Μούργα	—————→
Μεταλλική	—————→
Ταγγό	—————→
Άλλα (να καθορισθούν)	—————→
ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΤΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ	
Φρουτώδες	—————→
Πικρό	—————→
Πικάντικο	—————→

Όνομα δοκιμαστήΚωδικός δείγματοςΗμερομηνία

▼ **M19****ΠΡΟΣΑΡΤΗΜΑ 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) οι τιμές της κατανομής (X) να είναι μικρότερες από τον αριθμό αυτό (X_m), είναι μικρότερη ή ίση με 0,5 και ότι, ταυτόχρονα, η πιθανότητα (P) οι τιμές της κατανομής (X) να είναι 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' αύξουσα 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

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

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 et Kendall. Ο τύπος της ασυμπτωτικής τυπικής απόκλισης S εξαρτάται από το N και το IQR. N είναι ο αριθμός των παρατηρήσεων και IQR το διατεταρτημοριακό διάστημα, δηλαδή η σταθερή εκτίμηση της διακύμανσης των εξεταζόμενων δεδομένων (το διατεταρτημοριακό διάστημα περιλαμβάνει ακριβώς το 50 % των περιπτώσεων μιας οποιασδήποτε κατανομής πιθανότητας). Ο υπολογισμός του διατεταρτημοριακού διαστήματος πραγματοποιείται υπολογίζοντας το μέγεθος της απόκλισης μεταξύ του 75ου και του 25ου εκατοστημορίου.

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

Εκατοστημόριο είναι η τιμή X_{pc} που χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι η πιθανότητα (P) οι τιμές της κατανομής να είναι μικρότερες της X_{pc} είναι μικρότερη ή ίση με ένα καθορισμένο εκατοστό και ότι, ταυτόχρονα, η πιθανότητα (P) οι τιμές της κατανομής να είναι 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.

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

Με άλλα λόγια, 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 %

$$\text{CVR} = \frac{S}{Me} 100$$

▼ M19

Ο CVR είναι καθαρός αριθμός, δηλαδή χωρίς διαστάσεις, που δείχνει το ποσοστό διακύμανσης της αναλυόμενης σειράς αριθμών σε σχέση με την τιμή Me της διάμεσης τιμής. Για το λόγο αυτό, ο συντελεστής αυτός είναι πολύ χρήσιμος για την επαλήθευση της αξιοπιστίας των μελών της ομάδας.

Όρια εμπιστοσύνης 95 % στη διάμεση τιμή

Τα όρια εμπιστοσύνης (I.C.) 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 CVR %, της αξιοπιστίας της δοκιμής.

$$\text{I.C. ανώτατο} = \text{Me} + (c.S)$$

$$\text{I.C. S κατώτατο} = \text{Me} - (c.S)$$

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

Η κατάταξη γίνεται συγκρίνοντας τις διάμεσες τιμές με τα διαστήματα αναφοράς που καθορίζονται στο σημείο 5.3 της μεθόδου. Το λογισμικό επιτρέπει την οπτική απεικόνιση της κατάταξης σε πίνακα στατιστικών δεδομένων ή σε γράφημα.

▼B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIII

▼M6

ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

▼B

1. ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

1.1. Α. Εξουδετέρωση του ελαίου

1.1.1. Εξοπλισμός

- γυάλινο ποτήρι 300 ml υψηλού σχήματος,
- εργαστηριακή φυγόκεντρος με σωλήνες των 100 ml.
- γυάλινο ποτήρι των 250 ml.
- σφαιρικές φιάλες των 100 ml.
- διαχωριστική χοάνη ενός λίτρου.

1.1.2. Αντιδραστήρια

- υδατικό διάλυμα 12 % υδροξειδίου του νατρίου,
- αιθανολικό διάλυμα 1 % φαινολοφθαλεΐνης,
- εξάνιο καθαρό, p.a.,
- ισοπροπυλική αλκοόλη p.a.

1.1.3. Τρόπος εργασίας

- α) Έλαια οξύτητας ►C1 εκπεφρασμένης ◀ σε ελαϊκό οξύ μέχρι 30 %.

Τοποθετούμε 50 g ακατεργάστου ελαίου μέσα σε υψηλό ποτήριο ζέσεως των 300 ml και θερμαίνουμε σε υδρόλουτρο μέχρι τους 65 °C. Αναδεύοντας αργά, προσθέτουμε ποσότητα διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 12 % αντιστοιχούσα στην ελεύθερη οξύτητα του ελαίου, με περίσσεια 5 %. Συνεχίζουμε την ανάδευση για πέντε λεπτά διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 65 °C.

Μεταφέρουμε το μείγμα στους δοκιμαστικούς σωλήνες της φυγόκεντρος των 100 ml, και διαχωρίζουμε το σαπούνι με φυγόκεντρωση. Αποχύνουμε και μεταγγίζουμε το έλαιο σε ποτήρι ζέσεως των 250 ml, το ξεπλένουμε με 50 έως 60 ml ζέοντος απεσταγμένου ύδατος, απομακρύνοντας συγχρόνως τη στοιβάδα του ύδατος με σιφόνιο. Επαναλαμβάνουμε τις εκπλύσεις μέχρις ότου εξαφανισθούν τα ίχνη υπολειμμάτων σάπωνος (εξαφάνιση της ροδαλής χροιάς της φαινολοφθαλεΐνης).

Φυγοκεντρούμε το έλαιο προκειμένου να απομακρύνουμε τις απομένουσες μικρές ποσότητες νερού.

- β) Έλαια οξύτητας εκπεφρασμένης σε ελαϊκό οξύ άνω του 30 %

Εντός διαχωριστικής χοάνης του ενός λίτρου διαβιβάζουμε 50 g ακατεργάστου ελαίου, 200 ml εξάνιου, 100 ml ισοπροπυλικής αλκοόλης και ποσότητα διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 12 % αντιστοιχούσα στην ελεύθερη οξύτητα του ελαίου με περίσσεια 0,3 %.

Αναδεύουμε ισχυρά για ένα λεπτό. Προσθέτουμε 100 ml απεσταγμένου ύδατος, αναταράσσουμε εκ νέου και αφήνουμε να ηρεμήσει.

Μετά τον διαχωρισμό των στοιβάδων, αφήνουμε να εκχυθεί η καλύτερη στοιβάδα, που περιέχει τους σάπωνες. Μεταξύ των δύο στοιβάδων (ελαιώδης προς τα άνω και υδατίνη προς τα κάτω) δημιουργείται συχνά μια ενδιάμεση στοιβάδα από μικηλίωμα και αδιάλυτα συστατικά η οποία πρέπει επίσης να απομακρυνθεί.

1.2. Β. Αποχρωματισμός του εξουδετερωμένου ελαίου

1.2.1. Εξοπλισμός

- σφαιρική φιάλη των 250 ml με τρεις λαιμούς εσφυρισμένους για την τοποθέτηση:
 - α) θερμομέτρου βαθμολογημένου σε βαθμούς και επιτρεπόντος τη λήψη ενδείξεων μέχρι τους 90 °C.

▼B

- β) μηχανικού αναδευτήρα πραγματοποιούντος 250 έως 300 στροφές το λεπτό, καταλλήλου για εργασία εν κενώ·
 - γ) συνδέσεως με αντλία κενού.
- αντλία κενού εφοδιασμένη με μανόμετρο, δυναμένη να δώσει πιέσεις 15 έως 30 millibars.

1.2.2. Τρόπος εργασίας

Ζυγίζουμε περίπου 100 g εξουδετερωθέντος ελαίου έντος της τριλάιμου σφαιρικής φιάλης. Εισάγουμε το θερμόμετρο και τον αναδευτήρα, συνδέουμε την αντλία κενού και θερμαίνουμε στους 90 °C αναδεύοντας συνεχώς. Διατηρούμε τη θερμοκρασία αυτή, πάντα υπο ανάδευση, μέχρις ότου το προς ανάλυση έλαιο απαλλαγεί πλήρως, από την υγρασία, (περίπου για 30 λεπτά). Τότε διακόπτουμε το κενό και προσθετούμε 2 έως 3 g ενεργού γης. Αποκαθιστούμε το κενό έως ότου η παραμένουσα πίεση φθάσει τα 15 έως 30 millibars και, διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 90 °C αναδεύουμε επί τριάντα λεπτά με 250 στροφές ανά λεπτό περίπου.

▼M19

Εν συνεχεία διηθούμε εν θερμώ εντός κλιβάνου ρυθμιζομένης θερμοκρασία (50 έως 60 °C).



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XV

1. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΕΛΑΙΟ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΠΥΡΗΝΩΝ

1.1. Εξοπλισμός

- κατάλληλη συσκευή εκχυλίσεως 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, ρυθμισμένος στους 103 ± 2 °C με μηχανισμό εμφύσησεως αέρος η μειώσεως της πίεσεως,
- 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 εκχυλίσεως και υδρόφιλος βάμβαξ ◄ ή διηθητικός χάρτης, απαλλαγμένα συστατικών εκχυλιζομένων 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 τοποθετήσεως του ετοιμού δακτύλιου (ή του διηθητικού χάρτου) επί τι χρονικό διάστημα μέσα σε φούρνο θερμανθέντα σε θερμοκρασία όχι ανώτερη των 80 °C γιά να ελαττώσουμε την περιεκτικότητα σε υγρασία και πτητικές ύλες κάτω του 10 %.

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 γιά διάστημα τουλάχιστον μίας ώρας.

▼B

2.6. Πρώτη εκχύλιση

Μέσα στη συσκευή εκχυλίσεως 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 εκχυλίσεως 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 εκχυλίσεως ψύχουμε. Απομακρύνουμε ►C1 τη φύσιγγα ◀ από τη συσκευή εκχυλίσεως 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 εκχυλίσεως.

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

Το λαμβανόμενο στη φιάλη εκχυλίσεως 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 $103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ για 20 λεπτά. Διευκολύνουμε την απομάκρυνση αυτή είτε δι' εμφυσήσεως, κατά διαλείμματα αέρος, ή προτιμότερο αδρανούς αερίου, είτε διά μειώσεως 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:

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

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:

▼B

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

όπου:

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

U = είναι η περιεκτικότητα σε υγρασία και πτητικές ύλες.

3.2. Επαναληπτικότητα

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 I

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 πάμα, 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 οξειδωσης, οι φιάλες αφήνονται σε σκοτεινό μέρος επί 2 ώρες.

Μετά την πάροδο του απαιτούμενου χρόνου προστίθενται σε καθεμία από τις φιάλες 20 ml διαλύματος ιωδιούχου 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:

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

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,

V₂ = 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 ασαπωνοποίητων 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 επίστροφή 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 σκληρυμένη βελόνη.
- 4.10. Ηλεκτρικό θερμαντήρα ή εστία.

5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

▼ **M11**

- 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 σβόλοι, 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-εικοσιενεανενίου 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.

6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

6.1. Προετοιμασία των ασαπωνοποίητων 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 ζοηράς επί 30 δευτερόλεπτα και αφήνεται να ηρεμήσει μέχρι να σχηματισθούν οι στιβάδες.

▼ **M11***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 έκλυση 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 έκλυση 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.

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 εγχεόμενου διαλύματος: 1ml.

▼ **M11**

- 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 εξευγενισμένου 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 στιγμασταδένιο προσδιορίζεται βάσει του τύπου:

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

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)

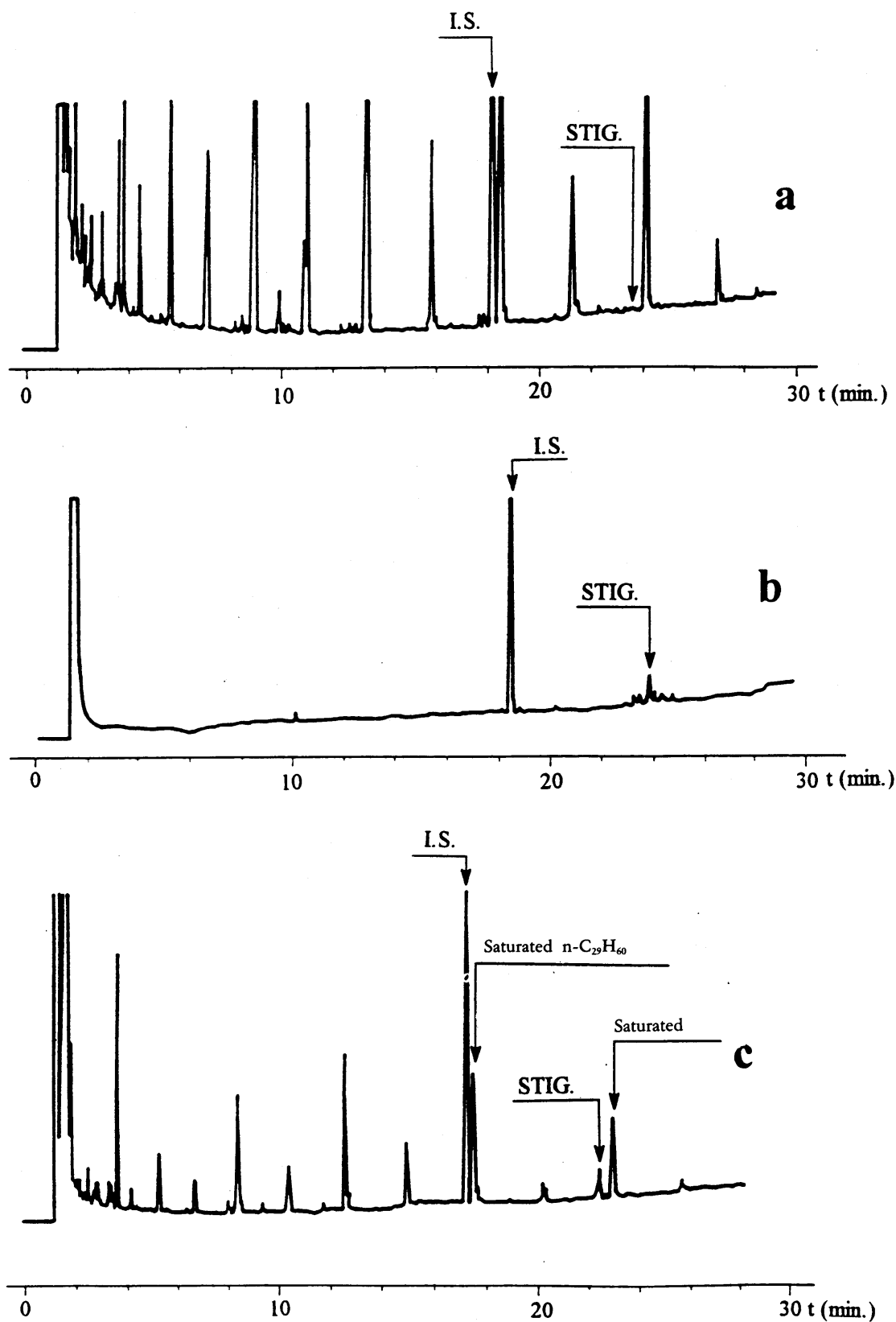
A_c = εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (χολησταδένιο)

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



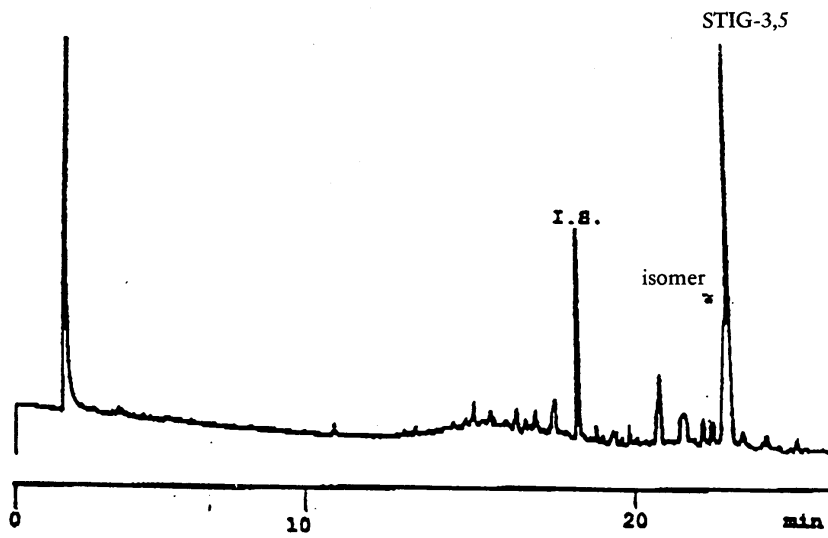
Σχήμα 1

Χρωματογραφήματα αερίου ληφθέντα από δείγματα ελαιόλαδου 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.

- 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.

▼ M11

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.

▼ **M13***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVIII***ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΜΕ ECN42 (ΔΙΑΦΟΡΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΕΛΟΜΕΝΩΝ ΗPLC ΚΑΙ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ)****1. Αντικείμενο**

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των τριγλυκεριδίων (TAG) στα ελαιόλαδα με τη βοήθεια του ισοδύναμου αριθμού άνθρακα από τις διαφορές μεταξύ των αναλυτικών αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και της θεωρητικής τιμής περιεκτικότητας, που υπολογίζεται αρχίζοντας από τη σύνθεση των λιπαρών ουσιών.

2. Πεδίο εφαρμογής

Το πρότυπο αυτό εφαρμόζεται στα ελαιόλαδα. Η μέθοδος ισχύει για την ανίχνευση της παρουσίας μικρών ποσοτήτων σπορέλαιων (πλούσιων σε λινελαϊκό οξύ) σε κάθε κατηγορία ελαιολάδων.

3. Αρχή

Στο αυθεντικό ελαιόλαδο, η θεωρητική τιμή της περιεκτικότητας των τριγλυκεριδίων με ECN42 [υπολογιζόμενη με βάση τον προσδιορισμό της σύνθεσης των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία (GLC)] αντιστοιχεί, εντός ορισμένων ορίων με την περιεκτικότητα των τριγλυκεριδίων που προσδιορίζεται με ανάλυση με ECN42. Διαφορές μεγαλύτερες των τιμών που ορίζονται στον κανονισμό για κάθε τύπο ελαιολάδου καταδεικνύουν ότι το λάδι περιέχει σπορέλαια.

4. Μέθοδος

Η μέθοδος για τον υπολογισμό της θεωρητικής τιμής της περιεκτικότητας των τριγλυκεριδίων με ECN42 καθώς και η διαφορά της από την τιμή που λαμβάνεται από την ανάλυση HPLC υπολογίζονται μέσω άλλων μεθόδων. Διακρίνονται τρεις φάσεις: προσδιορισμός της σύνθεσης των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης, υπολογισμός θεωρητικής σύνθεσης τριγλυκεριδίων με ECN42, προσδιορισμός τριγλυκεριδίων με ECN42 με HPLC.

4.1. Όργανα

- 4.1.1. Σφαιρικές φιάλες των 250 και 500 ml.
- 4.1.2. Ποτήρια ζέσεως των 100 ml.
- 4.1.3. Γυάλινη στήλη χρωματογραφίας, εσωτερικής διαμέτρου 21 mm, μήκους 450 mm, εφοδιασμένη με στρόφιγγα και με εσμυρισμένη κωνική υποδοχή στην κορυφή της.
- 4.1.4. Διαχωριστική χοάνη των 250 ml με αρσενικό κωνικό εσμύρισμα κατάλληλο για να προσαρμοστεί στην κορυφή της στήλης.
- 4.1.5. Γυάλινη ράβδος μήκους 600 mm.
- 4.1.6. Γυάλινη χοάνη διαμέτρου 80 mm.
- 4.1.7. Ογκομετρικές φιάλες των 50 ml.
- 4.1.8. Ογκομετρικές φιάλες των 20 ml.
- 4.1.9. Περιστροφικός εξατμιστής.
- 4.1.10. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης που επιτρέπει τον θερμοστατικό έλεγχο της θερμοκρασίας της στήλης.
- 4.1.11. Βρόγχος εισόδου των 10 μl.
- 4.1.12. Ανιχνευτής: διαφορετικό διαθλασίμετρο. Η ευαισθησία πλήρους κλίμακας πρέπει να είναι τουλάχιστον 10^{-4} μονάδες δείκτη διάθλασης.
- 4.1.13. Στήλη: σωλήνας από ανοξείδωτο χάλυβα μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,5 mm· πληρωμένη με σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου με 22-23 % άνθρακα σε μορφή δεκαοκτυλοσιλανίου, διαμέτρου 5 μm (σημείωση 2).

▼ **M13**

4.1.14. Καταγραφέας ή/και ολοκληρωτής.

4.2. **Αντιδραστήρια**

Τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας. Οι διαλύτες έκλουσης πρέπει να είναι απαερωμένοι, και να μπορούν να ανακυκλωθούν αρκετές φορές χωρίς επίδραση στους διαχωρισμούς.

- 4.2.1. Πετρελαϊκός αιθέρας, σ.ζ. 40-60 °C, για χρωματογραφία.
- 4.2.2. Αποσταγμένος αιθυλαιθέρας, απαλλαγμένος υπεροξειδίων.
- 4.2.3. Διαλύτης έκλουσης για χρωματογραφία στήλης: μείγμα πετρελαϊκού αιθέρα/αιθυλαιθέρα 87/13 (v/v).
- 4.2.4. Πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (Silica gel), 70-230 mesh, 7734 Merck, σταθερής περιεκτικότητας σε νερό 5 % (w/w).
- 4.2.5. Υαλοβάμβακας.
- 4.2.6. Ακετόνη.
- 4.2.7. Ακετονιτρίλιο.
- 4.2.8. Διαλύτης έκλουσης HPLC: ακετονιτρίλιο + ακετόνη (οι αναλογίες ρυθμίζονται ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός: αναλογία εκκίνησης 50:50).
- 4.2.9. Διαλύτης διαλυτοποίησης: ακετόνη ή μείγμα ακετόνης-χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1.
- 4.2.10. Τριγλυκερίδια αναφοράς: μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε τριγλυκερίδια του εμπορίου (τριπλαιμίνη, τριελαΐνη κ.λπ.) και να σχεδιαστεί καμπύλη των χρόνων κατακράτησης συναρτήσει του ισοδύναμου αριθμού άνθρακα ή εναλλακτικά, χρωματογραφήματα αναφοράς από μείγμα σογιέλαιου-αυθεντικού ελαιόλαδου σε αναλογία 30:70 (βλέπε σημειώσεις 3 και 4 και σχήματα 1, 2, 3 και 4).

4.3. **Προετοιμασία δείγματος**

Δεδομένου ότι η παρεμβολή ορισμένων ουσιών μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένο θετικό αποτέλεσμα, το δείγμα πρέπει πάντα να καθαρίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο IUPAC 2.507, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των πολικών συστατικών σε οξειδωμένα έλαια.

4.3.1. Παρασκευή της χρωματογραφικής στήλης

Η στήλη (4.1.3) πληρούνται με 30 ml περίπου διαλύτη έκλουσης (4.2.3): εισάγεται βύσμα υαλοβάμβακα (4.2.5), που σπρώχνεται με τη γυάλινη ράβδο (4.1.5) μέχρι το άκρο της στήλης.

Μέσα σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml, παρασκευάζεται αιώρημα 25 g πηκτής διοξειδίου (4.2.4) μέσα σε 80 ml μείγματος έκλουσης (4.2.3) και μεταγγίζεται στη στήλη με τη βοήθεια χωνιού (4.1.6).

Για να διασφαλιστεί ότι έχει μεταφερθεί όλο το πυριτικό οξύ στη στήλη, το ποτήρι ζέσεως εκπλένεται με το μείγμα έκλουσης και το υγρό της πλύσης μεταφέρεται και αυτό εντός της στήλης.

Η στρόφιγγα της στήλης ανοίγεται και το διάλυμα εκρέει έως ότου η στάθμη του διαλύτη έκλουσης βρίσκεται 1 cm πάνω από το silica gel.

4.3.2. Χρωματογραφία στήλης

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml (4.1.7) ζυγίζονται $2,5 \pm 0,1$ g με ακρίβεια 0,001 γ. διαθνημένου, ομογενοποιημένου και, αν κρίνεται αναγκαίο, αφυδατωμένου λαδιού, και διαλύονται σε 20 ml περίπου διαλύτη έκλουσης (4.2.3). Αν θεωρείται απαραίτητο, το σύνολο θερμαίνεται ελαφρά για να διευκολυνθεί η διάλυση, στη συνέχεια το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και, τέλος, συμπληρώνεται ο όγκος του με διαλύτη έκλουσης.

Με τη βοήθεια βαθμολογημένου σιφονιού, προστίθενται στη στήλη 20 ml διαλύματος, όπως παρασκευάστηκε στο σημείο (4.3.1). Η στρόφιγγα ανοίγεται και ο διαλύτης εκρέει, έως ότου η στάθμη του εξισωθεί με τη στάθμη του silica gel.

▼ **M13**

Εν συνεχεία, εκλούονται 150 ml διαλύτη έκλουσης (4.2.3), η δε παροχή ρυθμίζεται σε 2 ml/min (κατά τρόπο ώστε τα 150 ml να εκρεύουν από τη στήλη σε 60-70 λεπτά).

Το έκλουσμα συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη (4.1.1) των 250 ml, που έχει προηγουμένως ξηρανθεί μέχρι σταθερού βάρους και ζυγιστεί με ακρίβεια. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση (Rotavapor) και ζυγίζεται το υπόλειμμα το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή του διαλύματος για την ανάλυση HPLC και την παρασκευή των μεθυλεστέρων.

Η ανάκτηση του δείγματος από τη στήλη πρέπει να είναι κατά 90 % τουλάχιστον για τις κατηγορίες εξαιρετικό παρθένο, παρθένο, κοινό εξευγενισμένο και ελαιόλαδο και τουλάχιστον 80 % για το μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο και τα πυρηνέλαια.

4.4. **Ανάλυση HPLC**

4.4.1. Προετοιμασία των δειγμάτων για χρωματογραφική ανάλυση

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml, παρασκευάζεται διάλυμα 5 % του δείγματος προς ανάλυση δια ζυγίσεως $0,5 \pm 0,001$ g του δείγματος και συμπλήρωση του όγκου με το διαλύτη διαλυτοποίησης μέχρι τα 10 ml (4.2.9).

4.4.2. Τρόπος εργασίας

Το χρωματογραφικό σύστημα τίθεται σε λειτουργία. Ο διαλύτης έκλουσης (4.2.8) αντλείται με παροχή 1,5 ml/min για να καθαριστεί ολόκληρο το σύστημα. Αφήνεται έως ότου ληφθεί μία σταθερή γραμμή βάσης.

Εγχέονται 10 μl του δείγματος, όπως αυτό παρασκευάστηκε στο 4.3.

4.4.3. Υπολογισμός και έκφραση των αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιείται η μέθοδος κανονικοποίησης, δηλαδή υποτίθεται ότι το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών που αντιστοιχούν στα τριγλυκερίδια από ECN 42 έως ECN 52 ισούται με 100 %. Η σχετική εκατοστιαία αναλογία κάθε τριγλυκεριδίου υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο:

ποσοστό επί % τριγλυκεριδίου = εμβαδόν κορυφής × 100 / άθροισμα εμβαδών κορυφών,

Τα αποτελέσματα πρέπει να περιέχουν τουλάχιστον δύο δεκαδικά ψηφία.

Σημείωση 1: Η σειρά έκλουσης μπορεί να προσδιοριστεί υπολογίζοντας τους ισοδύναμους αριθμούς άνθρακα, συχνά καθοριζόμενους από τη σχέση $ECN = CN - 2n$, όπου CN είναι ο αριθμός άνθρακα και n ο αριθμός των διπλών δεσμών. Μπορεί, όμως, να υπολογιστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια λαμβάνοντας υπόψη την προέλευση των διπλών δεσμών. Εάν n_o , n_i και n_m είναι οι αριθμοί των διπλών δεσμών που αποδίδονται στο ελαϊκό, λινολεϊκό και λινολενικό οξύ αντίστοιχα, ο ισοδύναμος αριθμός άνθρακα μπορεί να υπολογιστεί από μία σχέση της μορφής::

$$ECN = CN - d_o n_o - d_i n_i - d_m n_m,$$

όπου οι συντελεστές d_o , d_i και d_m μπορούν να υπολογιστούν με χρήση των τριγλυκεριδίων αναφοράς. Στις συνθήκες που καθορίζονται σε αυτή τη μέθοδο, η σχέση που λαμβάνεται είναι περίπου:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_i) - (2,17 n_m)$$

Σημείωση 2: Παραδείγματα: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333

Lichrosphere ή αντίστοιχο (Merck) 100 CH18 Art 50377.

Σημείωση 3: Με αρκετά τριγλυκερίδια αναφοράς είναι επίσης δυνατό να υπολογιστεί η διακριτική ικανότητα αναφορικά με την τριελαΐνη,

▼ **M13**

$$\alpha = RT' = RT' \text{ τριελαΐνης}$$

χρησιμοποιώντας τον ανηγμένο χρόνο κατακράτησης $RT' = RT' - RT$ διαλύτη

Η καμπύλη τιμών του $\log \alpha$ συναρτήσει του f (αριθμός διπλών δεσμών) επιτρέπει τον προσδιορισμό των τιμών του χρόνου κατακράτησης για όλα τα τριγλυκερίδια των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα τριγλυκερίδια αναφοράς (βλέπε σχήμα 2).

Σημείωση 4: Η αποτελεσματικότητα της στήλης πρέπει να επιτρέπει σαφή διαχωρισμό της κορυφής της τριλινελαΐνης από τις κορυφές των τριγλυκεριδίων με παραπλήσιο RT . Η έκλουση πραγματοποιείται μέχρι την κορυφή ECN 52.

Σημείωση 5: Για να διασφαλιστεί η ορθή μέτρηση των εμβαδών όλων των κορυφών, πρέπει η δεύτερη κορυφή που αντιστοιχεί στο ECN 50 να είναι το 50 % της πλήρους κλίμακος του καταγραφέα.

4.5. **Υπολογισμός της σύστασης των τριγλυκεριδίων**

4.5.1. Προσδιορισμός της σύστασης λιπαρών οξέων

Η σύσταση των λιπαρών οξέων προσδιορίζεται με βάση τη μέθοδο αέριας χρωματογραφίας (ΕΟΚ), η οποία αναφέρεται στο παράρτημα Χ κεφάλαιο Α του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91, και κατά την οποία χρησιμοποιείται τριχοειδής στήλη. Η παρασκευή των μεθυλεστέρων πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στο παράρτημα Χ κεφάλαιο Β (αντίδραση με μεθυλικό νάτριο σε διάλυμα ακλοόλης) του ίδιου κανονισμού.

4.5.2. Λιπαρά οξέα που λαμβάνονται υπόψη κατά τους υπολογισμούς

Τα γλυκερίδια κατατάσσονται σε κατηγορίες ανάλογα με τους ισοδύναμους αριθμούς άνθρακα (ECN), λαμβάνοντας υπόψη τους ακόλουθες ισοδυναμίες μεταξύ του ECN και των λιπαρών οξέων. Λήφθηκαν υπόψη μόνο τα λιπαρά οξέα με 16 ή 18 άτομα άνθρακα διότι μόνο αυτά έχουν σημασία στην περίπτωση του ελαιόλαδου.

Λιπαρό οξύ (ΛΟ)	Συντομογραφία	Μοριακό βάρος (MB)	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 ποσοστού % του εμβαδού σε moles για όλα τα λιπαρά οξέα

$$\begin{aligned} \text{moles P} &= \frac{\% \text{ εμβαδ. P}}{\text{PM P}} & \text{moles S} &= \frac{\% \text{ εμβαδ. S}}{\text{PM S}} & \text{moles Po} &= \frac{\% \text{ εμβαδ. Po}}{\text{PM Po}} \\ \text{moles O} &= \frac{\% \text{ εμβαδ. O}}{\text{PM O}} & \text{moles L} &= \frac{\% \text{ εμβαδ. L}}{\text{PM L}} & \text{moles Ln} &= \frac{\% \text{ εμβαδ. Ln}}{\text{PM Ln}} \end{aligned} \quad (1)$$

▼ **M13**

4.5.4. Κανονικοποίηση των moles λιπαρών οξέων σε 100 %

$$\begin{aligned} \% \text{ moles P (1,2,3)} &= \frac{\text{moles P} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ moles S (1,2,3)} &= \frac{\text{moles S} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ moles Po (1,2,3)} &= \frac{\text{moles Po} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ moles O (1,2,3)} &= \frac{\text{moles O} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ moles L (1,2,3)} &= \frac{\text{moles L} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \% \text{ moles Ln (1,2,3)} &= \frac{\text{moles Ln} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \end{aligned} \quad (2)$$

Το αποτέλεσμα δίνει την εκατοστιαία αναλογία κάθε λιπαρού οξέως σε % moles στο σύνολο των θέσεων 1,2,3-των TAG.

Στη συνέχεια, υπολογίζεται το άθροισμα των κεκορεσμένων λιπαρών οξέων P και S (SFA) καθώς και των ακόρεστων λιπαρών οξέων Po, O, L και Ln (UFA):

$$\begin{aligned} \% \text{ moles SFA} &= \% \text{ moles P} + \% \text{ moles S} \\ \% \text{ moles UFA} &= 100 - \% \text{ moles AGS.} \end{aligned} \quad (3)$$

4.5.5. Υπολογισμός της σύνθεσης των TAG σε λιπαρά οξέα στις θέσεις 2- και 1,3-

Τα λιπαρά οξέα κατανέμονται σε τρία σύνολα κατά τον ακόλουθο τρόπο: δύο πανομοιότυπα για τις θέσεις 1- και 3- και ένα για τη θέση 2-, με διαφορετικούς συντελεστές για τα κεκορεσμένα οξέα (P και S) και για τα ακόρεστα (Po, O, L και Ln).

4.5.5.1. Κεκορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2- [P(2) και S(2)]

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

4.5.5.2. Ακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση 2- [Po(2), O(2), L(2) και Ln(2)]:

$$\begin{aligned} \% \text{ moles Po(2)} &= \frac{\% \text{ moles Po(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}] \\ \% \text{ moles O(2)} &= \frac{\% \text{ moles O(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}] \\ \% \text{ moles L(2)} &= \frac{\% \text{ moles L(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}] \\ \% \text{ moles Ln(2)} &= \frac{\% \text{ moles Ln(1,2,3)}}{\% \text{ moles AGI}} * [100 - \% \text{ moles P(2)} - \% \text{ moles S(2)}] \end{aligned} \quad (5)$$

▼ **M13**

4.5.5.3. Λιπαρά οξέα στις θέσεις 1,3- [P(1,3), S(1,3), Po(1,3) O(1,3), L(1,3) και Ln(1,3)]

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

4.5.6. Υπολογισμός των τριγλυκεριδίων

4.5.6.1. TAG με ένα μόνο λιπαρό οξύ (AAA· εν προκειμένω LLL, PoPoPo)

$$\% \text{ moles AAA} = \frac{\% \text{ moles A}(1,3) * \% \text{ moles A}(2) * \% \text{ moles A}(1,3)}{10000} \quad (7)$$

4.5.6.2. TAG με δύο λιπαρά οξέα (AAB· εν προκειμένω PoPoL, PoLL)

$$\begin{aligned} \% \text{ moles AAB} &= \frac{\% \text{ moles A}(1,3) * \% \text{ moles A}(2) * \% \text{ moles B}(1,3) * 2}{10000} \\ \% \text{ moles ABA} &= \frac{\% \text{ moles A}(1,3) * \% \text{ moles B}(2) * \% \text{ moles A}(1,3)}{10000} \end{aligned} \quad (8)$$

4.5.6.3. TAG με τρία διαφορετικά λιπαρά οξέα (ABC· εν προκειμένω OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln)

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

4.5.6.4. Τριγλυκερίδια με ECN42

Τα ακόλουθα τριγλυκερίδια με ECN42 υπολογίζονται βάσει των εξισώσεων 7, 8 και 9, ανάλογα με τη σειρά της αναμενόμενης έκλυσης στην HPLC (κανονικά 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

▼ **M13**

SLnLn και το ισομερές θέσης LnSLn

PPoLn και τα ισομερή θέσης PLnPo και PoPLn

Τα τριγλυκερίδια με ECN42 προκύπτουν από το άθροισμα των εννέα τριακυλογλυκερολών, συμπεριλαμβανομένων των ισομερών θέσης τους. Τα αποτελέσματα πρέπει να περιέχουν τουλάχιστον δύο δεκαδικά ψηφία.

5. **Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων**

Συγκρίνεται η υπολογιζόμενη θεωρητικός τιμή περιεκτικότητας με αυτή που προσδιορίστηκε από την ανάλυση HPLC. Εάν η διαφορά των θεωρητικών δεδομένων από τα δεδομένα της HPLC είναι μεγαλύτερη από τις τιμές που ορίζονται για την ανάλογη κατηγορία στον κανονισμό, αυτό σημαίνει ότι το δείγμα περιέχει σπορέλαιο.

Σημείωση: τα αποτελέσματα εκφράζονται με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου.

6. **Παράδειγμα** (οι αριθμοί αναφέρονται στα τμήματα του κείμενου της μεθόδου)

4.5.1. Υπολογισμός των % moles των λιπαρών οξέων από δεδομένα GLC (% του εμβαδού)

Τα ακόλουθα δεδομένα για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων λαμβάνονται με αέρια χρωματογραφία:

ΛΟ MB	P 256,4	S 284,5	Po 254,4	O 282,5	L 280,4	Ln 278,4
% του εμβ.	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

4.5.3. Μετατροπή του ποσοστού % του εμβαδού σε moles για όλα τα λιπαρά οξέα

$$\text{moles P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles P} \quad \text{Βλέπε τύπο (1)}$$

$$\text{moles S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles S} \quad \text{Βλέπε τύπο (1)}$$

$$\text{moles Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles Po} \quad \text{Βλέπε τύπο (1)}$$

$$\text{moles O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles O} \quad \text{Βλέπε τύπο (1)}$$

$$\text{moles L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles L} \quad \text{Βλέπε τύπο (1)}$$

$$\text{moles Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ moles Ln} \quad \text{Βλέπε τύπο (1)}$$

$$\text{Άθροισμα} = 0,35822 \text{ moles TG}$$

4.5.4. Κανονικοποίηση των moles λιπαρών οξέων σε 100 %

$$\% \text{ moles P}(1,2,3) = \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 10,888 \% \quad \text{Βλέπε τύπο (2)}$$

$$\% \text{ moles S}(1,2,3) = \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 2,944 \% \quad \text{Βλέπε τύπο (2)}$$

$$\% \text{ moles Po}(1,2,3) = \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,097 \% \quad \text{Βλέπε τύπο (2)}$$

$$\% \text{ moles O}(1,2,3) = \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 74,113 \% \quad \text{Βλέπε τύπο (2)}$$

▼ **M13**

$$\% \text{ moles L}(1,2,3) = \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 9,956 \% \quad \text{Βλέπε τύπο (2)}$$

$$\% \text{ moles Ln}(1,2,3) = \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,003 \% \quad \text{Βλέπε τύπο (2)}$$

$$\text{Συνολικά \% moles} = 100,0 \%$$

Άθροισμα των κεκορεσμένων και των ακόρεστων λιπαρών οξέων στις θέσεις 1,2,3- των TAG:

$$\% \text{ moles AGS} = 10,888 \% + 2,944 \% = 13,831 \% \quad \text{Βλέπε τύπο (3)}$$

$$\% \text{ moles AGI} = 100,000 \% - 13,831 \% = 86,169 \% \quad \text{Βλέπε τύπο (3)}$$

4.5.5. Υπολογισμός της σύνθεσης των TAG σε λιπαρά οξέα στις θέσεις 2- και 1,3-

4.5.5.1. Κεκορεσμένα οξέα στη θέση 2- [P(2) και S(2)]

$$\% \text{ moles P}(2) = 10,888 \% * 0,06 = 0,653 \% \quad \text{Βλέπε τύπο (4)}$$

$$\% \text{ moles S}(2) = 2,944 \% * 0,06 = 0,177 \% \quad \text{Βλέπε τύπο (4)}$$

4.5.5.2. Ακόρεστα λιπαρά οξέα στις θέσεις 1,3 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) και Ln(1,3)]

$$\% \text{ moles Po}(2) = \frac{1,097 \%}{86,169 \%} * (100 - -0,659 - 0,177) = 1,263 \% \text{ moles} \quad \text{Βλέπε τύπο (5)}$$

$$\% \text{ moles O}(2) = \frac{74,113 \%}{86,169 \%} * (100 - -0,659 - 0,177) = 85,295 \% \text{ moles} \quad \text{Βλέπε τύπο (5)}$$

$$\% \text{ moles L}(2) = \frac{9,956 \%}{86,169 \%} * (100 - -0,659 - 0,177) = 11,458 \% \text{ moles} \quad \text{Βλέπε τύπο (5)}$$

$$\% \text{ moles Ln}(2) = \frac{1,003 \%}{86,169 \%} * (100 - -0,659 - 0,177) = 1,154 \% \text{ moles} \quad \text{Βλέπε τύπο (5)}$$

4.5.5.3. Λιπαρά οξέα στις θέσεις 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) και Ln(1,3)]

$$\% \text{ moles P}(1,3) = \frac{10,888 - 0,659}{2} 10,888 = 16,005 \% \text{ moles} \quad \text{Βλέπε τύπο (6)}$$

$$\% \text{ moles S}(1,3) = \frac{2,944 - 0,177}{2} 2,944 = 4,327 \% \text{ moles} \quad \text{Βλέπε τύπο (6)}$$

$$\% \text{ moles Po}(1,3) = \frac{1,097 - 1,263}{2} 1,097 = 1,015 \% \text{ moles} \quad \text{Βλέπε τύπο (6)}$$

$$\% \text{ moles O}(1,3) = \frac{74,113 - 85,295}{2} 74,113 = 68,522 \% \text{ moles} \quad \text{Βλέπε τύπο (6)}$$

$$\% \text{ moles L}(1,3) = \frac{9,956 - 11,458}{2} 9,956 = 9,205 \% \text{ moles} \quad \text{Βλέπε τύπο (6)}$$

$$\% \text{ moles Ln}(1,3) = \frac{1,003 - 1,154}{2} 1,003 = 0,927 \% \text{ moles} \quad \text{Βλέπε τύπο (6)}$$

4.5.6. Υπολογισμός των τριακυλογλυκερολών

Από την υπολογιζόμενη περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα στη θέση 2- και στις θέσεις 1,3- (βλέπε παραπάνω):

ΛΟ σε	Θέσεις 1,3-	Θέση 2-
P	16,005 %	0,653 %

▼ M13

ΛΟ σε	Θέσεις 1,3-	Θέση 2-
S	4,327 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,263 %
O	68,522 %	85,295 %
L	9,205 %	11,458 %
Ln	0,927 %	1,154 %
Σύνολο	100,0 %	100,0 %

υπολογίζονται οι ακόλουθες τριακυλογλυκερόλες:

LLL

PoPoPo

PoLL με 1 ισομερές θέσης

S LnLn 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 λιπαρό οξύ (LLL, PoPoPo) Βλέπε τύπο (7)

$$\% \text{ moles LLL} = \frac{9,205 \% * 11,458 \% * 9,205 \%}{10\,000} = 0,09708 \text{ mol LLL}$$

$$\% \text{ moles PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 1,015 \%}{10\,000} = 0,00013 \text{ mol PoPoPo}$$

4.5.6.2. TAG με δύο λιπαρά οξέα (PoLL, S LnLn, PoPoL) Βλέπε τύπο (8)

$$\% \text{ moles PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,02141$$

$$\% \text{ moles LPoL} = \frac{9,205 \% * 1,263 \% * 9,205 \%}{10\,000} = 0,01070$$

0,03211 mol PoLL

$$\% \text{ moles S LnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,327 \% * 1,154 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00093$$

$$\% \text{ moles LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\,000} = 0,00002$$

0,00095 mol S LnLn

$$\% \text{ moles PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,00236$$

$$\% \text{ moles PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 1,015 \%}{10\,000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

4.5.6.3. TAG με τρία διαφορετικά λιπαρά οξέα (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) Βλέπε τύπο (9)

$$\% \text{ moles PPoLn} = \frac{16,005 \% * 1,263 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00375$$

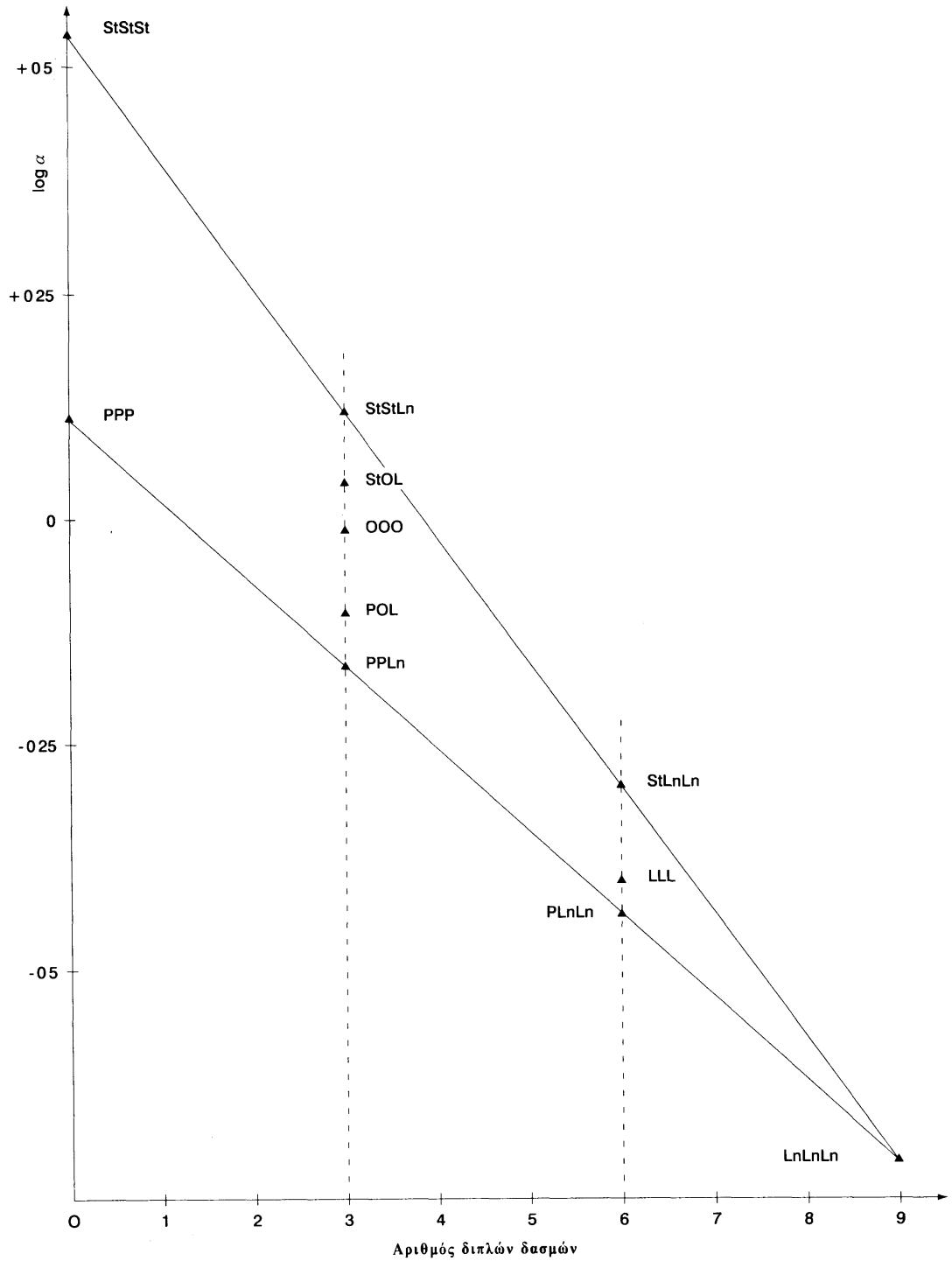
$$\% \text{ moles LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,00012$$

▼ **M13**

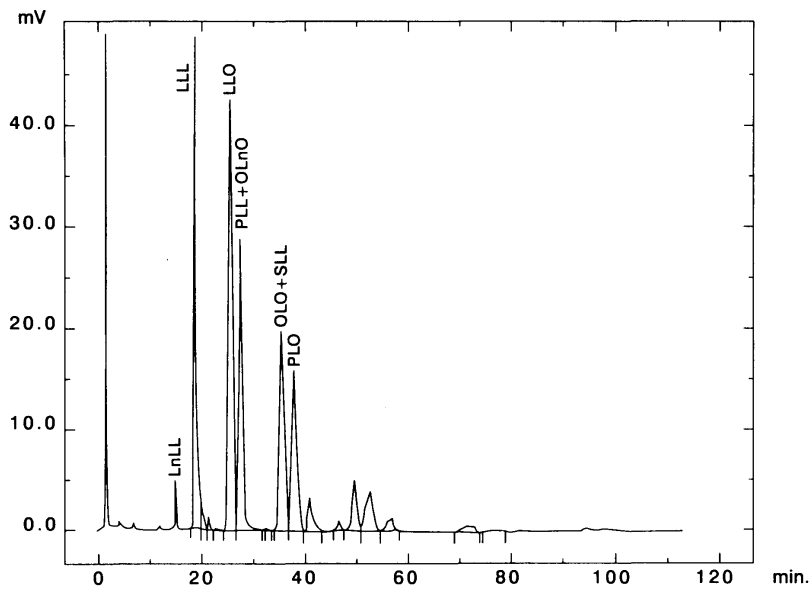
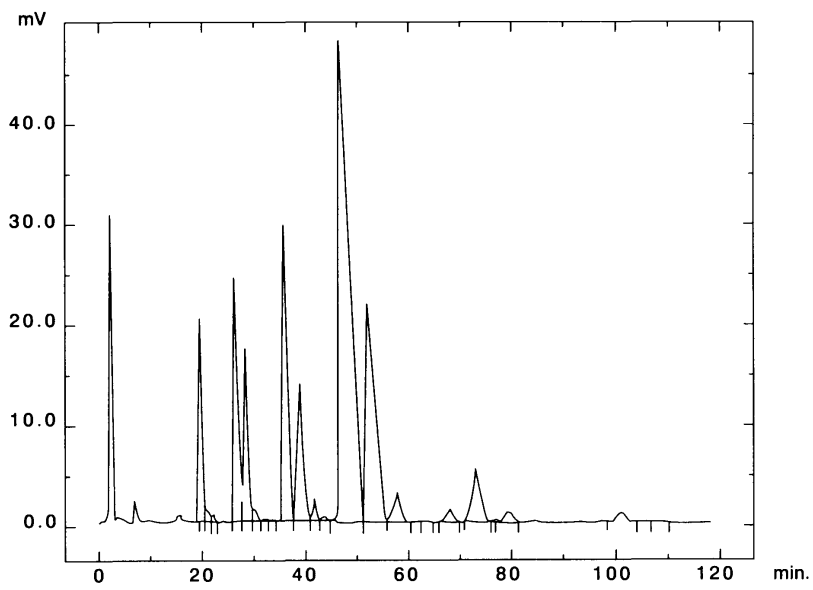
$$\begin{aligned}
\% \text{ moles PoLnP} &= \frac{1,015 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10\,000} = 0,00375 \\
&0,00762 \text{ mol PPoln} \\
\% \text{ moles OLLn} &= \frac{68,522 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,14577 \\
\% \text{ moles LnOL} &= \frac{0,927 \% * 85,295 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,14577 \\
\% \text{ moles LLnO} &= \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 68,522 \% * 2}{10\,000} = 0,14577 \\
&0,43671 \text{ mol OLLn} \\
\% \text{ moles PLLn} &= \frac{16,005 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,03400 \\
\% \text{ moles LnPL} &= \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,00111 \\
\% \text{ moles LLnP} &= \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10\,000} = 0,03400 \\
&0,06911 \text{ mol PLLn} \\
\% \text{ moles PoOLn} &= \frac{1,015 \% * 85,295 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,01605 \\
\% \text{ moles LnPoO} &= \frac{0,927 \% * 1,263 \% * 68,522 \% * 2}{10\,000} = 0,01605 \\
\% \text{ moles OLnPo} &= \frac{68,522 \% * 1,154 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,01605 \\
&0,04815 \text{ mol PoOLn} \\
\text{ECN42} &= 0,69540 \text{ mol TAG}
\end{aligned}$$

▼ **M14**

Σχήμα 1: Διάγραμμα του $\log \alpha$ σε συνάρτηση του f (αριθμός διπλών δεσμών)

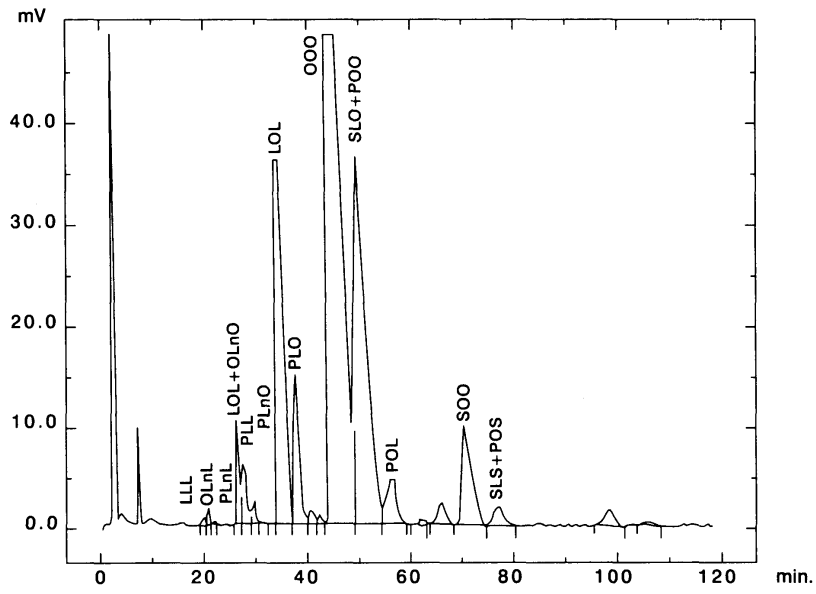


Σχήμα: La = Laurinsäure; My = Myristinsäure; P = Palmitinsäure; St = Stearinsäure; O = Ölsäure; L = Linolsäure; Ln = Linolensäure.

▼ **M14****Σχήμα 2:** Έλαιο σόγιας**Σχήμα 3:** Έλαιο σόγιας/Ελαιόλαδο 30/70

▼ M14

Σχήμα 4: Ελαιόλαδο



▼ **M19***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIX***ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΜΕΣΩ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΑΕΡΙΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΤΡΙΧΟΕΙΔΗ ΣΤΗΛΗ****1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ**

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 ασαπωνοποιητα συστατικά εκχυλίζονται με αιθυλαιθέρα. Το κλάσμα των αλκοολών διαχωρίζεται από το εκχύλισμα των ασαπωνοποιητών 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 πόμα 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).

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 4.1. Υδροξείδιο του καλίου, αιθανολικό διάλυμα περίπου 2 N: 130 g υδροξειδίου του καλίου (ελάχιστου τίτλου 85 %) διαλύονται υπό

▼ **M19**

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 διοξειδίο 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 υδροξειδίου 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. Διχλωρο-2'-7'-φλουορεσκεΐνη, αιθανολικό διάλυμα 0,2 %. Καθίσταται ελαφρώς βασικό με προσθήκη μερικών σταγονών αλκοολικού διαλύματος υδροξειδίου 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 σαπωνοποιήτων

- 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.

- 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 διαυγές). 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 δευτερό-

▼ **M19**

λεπτα και αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να επέλθει διαχωρισμός (σημείωση 1).

Η υποκείμενη υδατική φάση διαχωρίζεται συλλέγοντάς την σε άλλη διαχωριστική χοάνη. Πραγματοποιούνται ακόμη δύο εκχυλίσεις 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 άνυδρου 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. Ετομασία 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 χλωριούχο 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 (*).

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 έκλυσης: 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.

Σημείωση 3: Για να έχουμε απολύτως αναπαραγώγιμες συνθήκες έκλυσης, 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.

(*) Σε ιδιαίτερες περιπτώσεις, για να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός των λωρίδων πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως μείγμα έκλυσης βενζόλιο-ακετόνη 95/5 (V/V).

▼ **M19**

- 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'-φλουορεσκεΐνης. 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 διοξείδιο του πυριτίου που περιλαμβάνεται στην οριοθετημένη ζώνη. Το ξύσμα εισάγεται στη χοάνη διήθησεως (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 διήθησεως.

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 διήθησεως 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 σιλυλίωσης, το οποίο είναι μείγμα πυριδίνης-εξαμεθυλοδισιλαζάνιου-τριμεθυλοχλωροσιλανίου 9/3/1 (V/V/V) (σημείωση 5) σε αναλογία 50 μl ανά χιλιοστόγραμμα αλειφατικών αλκοολών, αποφεύγοντας κάθε απορρόφηση υγρασίας (σημείωση 6).

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 αντιδραστηρίου 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 διαυγές διάλυμα είναι έτοιμο για ανάλυση με αεριοχρωματογραφική ανάλυση.

▼ **M19**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 συνήθους 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 καταγραφέα, ρύθμιση της θερμοκρασίας του θαλάμου για τη στήλη, του ανιχνευτή και του εκκινήτηρα 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,
- 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.

▼ **M19**

- 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.

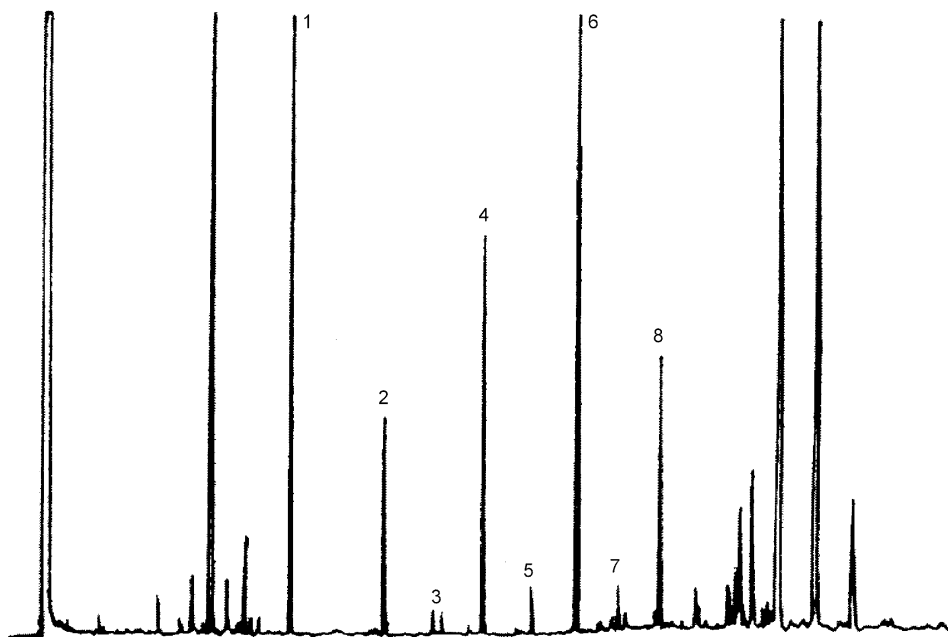
6. **ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

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 εξόδου 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 = Εικοσιδυνόλη
- 3 = Εικοσιτριανόλη
- 4 = Εικοσιτετρανόλη
- 5 = Εικοσιπεντανόλη
- 6 = Εικοσιεξανόλη
- 7 = Εικοσιεπτανόλη
- 8 = Εικοσιοκτανόλη