

Το κείμενο αυτό αποτελεί απλώς εργαλείο τεκμηρίωσης και δεν έχει καμία νομική ισχύ. Τα θεσμικά όργανα της Ένωσης δεν φέρουν καμία ευθύνη για το περιεχόμενό του. Τα αυθεντικά κείμενα των σχετικών πράξεων, συμπεριλαμβανομένων των προοιμίων τους, είναι εκείνα που δημοσιεύονται στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης και είναι διαθέσιμα στο EUR-Lex. Αυτά τα επίσημα κείμενα είναι άμεσα προσβάσιμα μέσω των συνδέσμων που περιέχονται στο παρόν έγγραφο

► B **ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**
της 11ης Ιουλίου 1991
σχετικά με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων καθώς
και με τις μεθόδους προσδιορισμού
 (ΕΕ L 248 της 5.9.1991, σ. 1)

Τροποποιείται από:

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

► <u>M25</u>	Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 299/2013 της Επιτροπής της 26ης Μαρτίου 2013	L 90	52	28.3.2013
► <u>M26</u>	Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1348/2013 της Επιτροπής της 16ης Δεκεμβρίου 2013	L 338	31	17.12.2013
► <u>M27</u>	Κατ' εξουσιοδότηση κανονισμός (ΕΕ) 2015/1830 της Επιτροπής της 8ης Ιουλίου 2015	L 266	9	13.10.2015
► <u>M28</u>	Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2015/1833 της Επιτροπής της 12ης Οκτωβρίου 2015	L 266	29	13.10.2015
► <u>M29</u>	Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2016/1227 της Επιτροπής της 27ης Ιουλίου 2016	L 202	7	28.7.2016
► <u>M30</u>	Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2016/1784 της Επιτροπής της 30ής Σεπτεμβρίου 2016	L 273	5	8.10.2016
► <u>M31</u>	Κατ' εξουσιοδότηση κανονισμός (ΕΕ) 2016/2095 της Επιτροπής της 26ης Σεπτεμβρίου 2016	L 326	1	1.12.2016
► <u>M32</u>	Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2019/1604 της Επιτροπής της 27ης Σεπτεμβρίου 2019	L 250	14	30.9.2019

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)
- **C3** Διορθωτικό ΕΕ L 211 της 17.8.2017, σ. 58 (2016/2095)

▼ 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

▼ M20*Άρθρο 1*

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

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

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

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

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

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

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

▼ **M26***Άρθρο 2*

1. Τα προβλεπόμενα στο παράρτημα I του παρόντος κανονισμού χαρακτηριστικά των ελαίων προσδιορίζονται σύμφωνα με τις ακόλουθες μεθόδους ανάλυσης:

- α) για τον προσδιορισμό των ελευθέρων λιπαρών οξέων, εκφραζόμενων σε εκατοστιαία αναλογία ελαϊκού οξέος, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα II·
- β) για τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα III·
- γ) για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε κηρούς, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα IV·
- δ) για τον προσδιορισμό της σύστασης και της περιεκτικότητας σε στερόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα V·
- ε) για τον προσδιορισμό της εκατοστιαίας αναλογίας μονοπαλμιτικού 2-γλυκερυλίου, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα VII·
- στ) για τη φασματοφωτομετρική ανάλυση, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα IX·

▼ **M28**

- ζ) για τον προσδιορισμό της συστάσεως σε λιπαρά οξέα, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα X·

▼ **M26**

- η) για τον προσδιορισμό των αλογονούχων πτητικών διαλυτών, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα XI·
- θ) για την αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παρθένων ελαιολάδων, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα XII·
- ι) για τον προσδιορισμό των στιγμασταδιενίων, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα XVII·
- ια) για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε τριγλυκερίδια με ECN42, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα XVIII·

▼ **M32**

- ιβ) για τον προσδιορισμό της σύνθεσης και της περιεκτικότητας σε στερόλες και τον προσδιορισμό των αλκοολούχων ενώσεων με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα XIX·

▼ **M26**

- ιγ) για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε κηρούς, καθώς και σε μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, εφαρμόζεται η μέθοδος που περιγράφεται στο παράρτημα XX·

▼ **M28**▼ **M26**

2. Ο έλεγχος των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παρθένων ελαιολάδων από τις εθνικές αρχές ή τους αντιπροσώπους τους διενεργείται από ομάδες δοκιμαστών αναγνωρισμένες από τα κράτη μέλη.

▼ M26

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

▼ M32

Σε περίπτωση που η ομάδα δοκιμαστών δεν επιβεβαιώσει τη δηλωθείσα κατηγορία ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, οι εθνικές αρχές ή οι αντιπρόσωποί τους αναθέτουν χωρίς καθυστέρηση, ύστερα από αίτηση του ενδιαφερομένου, τη διενέργεια δύο κατ' έφεση εξετάσεων από άλλες αναγνωρισμένες ομάδες, από τις οποίες η μία τουλάχιστον διενεργείται από ομάδα αναγνωρισμένη από το κράτος μέλος παραγωγής του ελαιολάδου. Τα υπόψη χαρακτηριστικά θεωρούνται σύμφωνα με τα δηλωθέντα, εάν οι δύο κατ' έφεση εξετάσεις επιβεβαιώσουν τη συγκεκριμένη κατάταξη. Σε αντίθετη περίπτωση, ανεξάρτητα από τον τύπο των ελαττωμάτων που διαπιστώθηκαν κατά τις κατ' έφεση εξετάσεις, η κατάταξη κηρύσσεται μη σύμφωνη με τα χαρακτηριστικά και τα έξοδα των κατ' έφεση εξετάσεων βαρύνουν τον ενδιαφερόμενο.

▼ M26

3. Κατά τον έλεγχο των χαρακτηριστικών των ελαίων από τις εθνικές αρχές ή τους αντιπροσώπους τους, όπως προβλέπεται στην παράγραφο 1, η δειγματοληψία διενεργείται σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα EN ISO 661 για την προετοιμασία δείγματος δοκιμής και EN ISO 5555 για τη δειγματοληψία. Ωστόσο, κατά παρέκκλιση από το σημείο 6.8 του προτύπου EN ISO 5555, για τις παρτίδες που αποτελούνται από τα εν λόγω έλαια σε άμεσες συσκευασίες, η δειγματοληψία διενεργείται σύμφωνα με το παράρτημα Ια του παρόντος κανονισμού. Στην περίπτωση των χυδών ελαιολάδων για τα οποία δεν μπορεί να εφαρμοστεί το πρότυπο EN ISO 5555, η δειγματοληψία διενεργείται σύμφωνα με τις υποδείξεις της αρμόδιας αρχής του κράτους μέλους.

Με την επιφύλαξη των διατάξεων του προτύπου EN ISO 5555 και του κεφαλαίου 6 του προτύπου EN ISO 661, τα δείγματα προφυλάσσονται από το φως και από υψηλές θερμοκρασίες το ταχύτερο δυνατό και αποστέλλονται στο εργαστήριο για ανάλυση το αργότερο την πέμπτη εργάσιμη ημέρα από τη λήψη τους. Σε αντίθετη περίπτωση, τα δείγματα φυλάσσονται κατά τρόπο ώστε να μην υποστούν υποβάθμιση ή φθορά κατά τη διάρκεια της μεταφοράς ή της αποθήκευσής τους προτού αποσταλούν στο εργαστήριο.

4. Για τους ελέγχους που προβλέπονται στην παράγραφο 3, οι αναλύσεις που αναφέρονται στα παραρτήματα II, III, IX, XII και XX, καθώς και, κατά περίπτωση, οι κατ' έφεση αναλύσεις που απαιτούνται βάσει της εθνικής νομοθεσίας, διεξάγονται πριν από την ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας στην περίπτωση των συσκευασμένων προϊόντων. Σε περίπτωση δειγματοληψίας χυδών ελαίων, οι αναλύσεις αυτές διεξάγονται το αργότερο τον έκτο μήνα ύστερα από τον μήνα κατά τον οποίο ελήφθη το δείγμα.

Δεν ισχύει καμία προθεσμία για τις άλλες αναλύσεις που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό.

Εάν τα αποτελέσματα των αναλύσεων δεν αντιστοιχούν στα χαρακτηριστικά της κατηγορίας ελαιολάδου ή πυρηνελαίου που δηλώθηκε, ο ενδιαφερόμενος ενημερώνεται σχετικά, το αργότερο έναν μήνα πριν από τη λήξη της προθεσμίας που ορίζεται στο πρώτο εδάφιο, εκτός εάν η δειγματοληψία διενεργήθηκε λιγότερο από δύο μήνες πριν από την ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας.

▼ **M26**

5. Για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων με τις μεθόδους που προβλέπονται στο πρώτο εδάφιο της παραγράφου 1, τα αποτελέσματα των αναλύσεων συγκρίνονται απευθείας με τα όρια που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό.

▼ **M25***Άρθρο 2α*

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

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

3. Τα κριτήρια αξιολόγησης του κινδύνου μπορεί να περιλαμβάνουν:

α) την κατηγορία του ελαίου, την περίοδο παραγωγής, την τιμή των ελαίων σε σχέση με άλλα φυτικά έλαια, τις εργασίες ανάμειξης και συσκευασίας, τις εγκαταστάσεις και τις συνθήκες αποθήκευσης, τη χώρα καταγωγής, τη χώρα προορισμού, τα μέσα μεταφοράς ή την ποσότητα της παρτίδας·

β) τη θέση των επιχειρήσεων στην αλυσίδα εμπορίας, την ποσότητα και/ή την αξία των προϊόντων που διαθέτουν στο εμπόριο, το φάσμα των κατηγοριών ελαίων που διαθέτουν στο εμπόριο, τον τύπο των δραστηριοτήτων που ασκούν, όπως η έκθλιψη, η αποθήκευση, το ραφινάρισμα, η ανάμειξη, η συσκευασία ή η λιανική πώληση·

γ) τα πορίσματα από προηγούμενους ελέγχους, συμπεριλαμβανομένων του αριθμού και του τύπου των ελαττωμάτων που διαπιστώθηκαν, τη συνήθη ποιότητα των ελαίων που διατίθενται στο εμπόριο, τις επιδόσεις του χρησιμοποιούμενου τεχνικού εξοπλισμού·

δ) την αξιοπιστία των συστημάτων διασφάλισης της ποιότητας των επιχειρήσεων ή των συστημάτων αυτοελέγχου σε σχέση με τη συμμόρφωση προς τις προδιαγραφές εμπορίας·

ε) τον τόπο διενέργειας του ελέγχου, ιδίως εάν αυτός είναι το σημείο πρώτης εισόδου στην Ένωση, το σημείο τελευταίας εξόδου από την Ένωση ή ο τόπος παραγωγής, συσκευασίας, φόρτωσης ή πώλησης των ελαίων στον τελικό καταναλωτή·

στ) κάθε άλλη πληροφορία που θα μπορούσε να δηλώνει κίνδυνο μη συμμόρφωσης.

4. Τα κράτη μέλη θεσπίζουν εκ των προτέρων:

α) τα κριτήρια αξιολόγησης του κινδύνου μη συμμόρφωσης παρτίδων·

β) βάσει ανάλυσης κινδύνου για κάθε κατηγορία κινδύνου, τον ελάχιστο αριθμό επιχειρήσεων ή παρτίδων και/ή ποσοτήτων που θα αποτελέσουν αντικείμενο ελέγχου συμμόρφωσης.

▼ M25

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

5. Τα κράτη μέλη επαληθεύουν τη συμμόρφωση:

α) με τη διεξαγωγή των αναλύσεων που προβλέπονται στο παράρτημα I, ανεξαρτήτως σειράς· ή

▼ M32

β) σύμφωνα με τη σειρά που προβλέπεται στο παράρτημα Ιβ σχετικά με το διάγραμμα ροής, μέχρι να υπάρξει κατάληξη σε μία από τις αποφάσεις που αναφέρονται από το εν λόγω διάγραμμα.

▼ M19**▼ M25***Άρθρο 3*

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

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

▼ M5*Άρθρο 4***▼ M19**

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

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

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

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

▼ M5

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

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

▼ M19**▼ B***Άρθρο 6*

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

▼ B

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

▼ M20*Άρθρο 7*

Εφαρμόζονται οι κοινοτικές διατάξεις όσον αφορά την παρουσία επιμολυντών.

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

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

▼ M25*Άρθρο 7α*

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

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

Άρθρο 8

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

2. Το αργότερο μέχρι τις 31 Μαΐου κάθε έτους, τα κράτη μέλη διαβιβάζουν στην Επιτροπή έκθεση σχετικά με την εφαρμογή του παρόντος κανονισμού κατά το προηγούμενο ημερολογιακό έτος. Η έκθεση περιλαμβάνει τουλάχιστον τα αποτελέσματα των ελέγχων συμμόρφωσης που διενεργήθηκαν στα ελαιόλαδα σύμφωνα με τα υποδείγματα που παρατίθενται στο παράρτημα XXI.

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

▼ B*Άρθρο 9*

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

Άρθρο 10

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

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

⁽¹⁾ ΕΕ L 228 της 1.9.2009, σ. 3.

▼ **M5**

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

▼ **B**

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

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

▼ **M32***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ***ΣΥΝΟΨΗ**

Παράρτημα I	Χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου
Παράρτημα Ia	Δειγματοληψία ελαιόλαδου ή πυρηνέλαιου που παραδίδονται σε άμεσες συσκευασίες
Παράρτημα Ib	Διάγραμμα ροής για την εξακρίβωση της συμφωνίας ενός δείγματος ελαιόλαδου με τη δηλωθείσα κατηγορία
Παράρτημα II	Προσδιορισμός των ελεύθερων λιπαρών οξέων, εν ψυχρό μέθοδος
Παράρτημα III	Προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων
Παράρτημα IV	Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε κηρούς με αέρια χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης
Παράρτημα VII	Προσδιορισμός της εκατοστιαίας αναλογίας 2-μονοπαλμιτίνης
Παράρτημα IX	Φασματοφωτομετρική εξέταση υπεριώδους
Παράρτημα X	Προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με αεριοχρωματογραφία
Παράρτημα XI	Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του ελαιόλαδου σε αλογονούχους πτητικούς διαλύτες
Παράρτημα XII	Μέθοδος του διεθνούς συμβουλίου ελαιοκομίας για την οργανοληπτική εξέταση παρθένου ελαιόλαδου
Παράρτημα XV	Περιεκτικότητα σε έλαιο των ελαιοπυρήνων
Παράρτημα XVI	Προσδιορισμός του αριθμού ιωδίου
Παράρτημα XVII	Μέθοδος προσδιορισμού των στιγμασταδιενίων σε φυτικά έλαια
Παράρτημα XVIII	Προσδιορισμός της διαφοράς μεταξύ πραγματικής και θεωρητικής περιεκτικότητας σε τριακυλογλυκερόλες με ECN 42
Παράρτημα XIX	Προσδιορισμός της σύνθεσης και της περιεκτικότητας σε στερόλες και αλκοολούχες ενώσεις με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης
Παράρτημα XX	Μέθοδος προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε κηρούς, καθώς και σε μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης
Παράρτημα XXI	Αποτελέσματα των αναφερόμενων στο άρθρο 8 παράγραφος 2 ελέγχων συμμόρφωσης για τα ελαιόλαδα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Χαρακτηριστικά ποιότητας

Κατηγορία	Οξύτητα (%) (*)	Αριθμός υπεροξειδίων (mEq O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₆₈ ή K ₂₇₀	δ-K	Οργανοληπτική εξέταση		Αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (mg/kg)
						Διάμεση τιμή των ελαττωμά-των (Md) (*)	Διάμεση τιμή του φρουτώδους (Mf)	
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Παρθένο ελαιόλαδο	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Μειονεκτικό ελαιόλαδο (λαμπάντε)	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 ⁽¹⁾	—	—
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένο ελαιόλαδο και παρθένα ελαιόλαδα	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	—	—	—	—	—		—	—
7. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Πυρηνέλαιο	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(¹) Η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων μπορεί να είναι μικρότερη ή ίση με 3,5 όταν η διάμεσος του φρουτώδους ισούται με 0,0.

Χαρακτηριστικά καθαρότητας

Κατηγορία	Σύσταση σε λιπαρά οξέα (1)						Ολικά ισομερή του trans-ελαϊκού οξέος (%)	Ολικά ισομερή του trans- λινελαϊκού + trans- λινολενικού οξέος (%)	Στιγμ- ασταδιένια (mg/kg) (2)	Διαφορά: μεταξύ ECN42 (HPLC) και ECN42 (θεωρητικός υπολογισμός)	2-μονοπαλμιτίνη (%)
	Μυριστικό (%)	Λινολενικό (%)	Αραχιδικό (%)	Εικοσενικό (%)	Βεχενικό (%)	Λιγνοκηρικό (%)					
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % > 14,00 %
2. Παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % > 14,00 %
3. Μειονεκτικό ελαιόλαδο (λαμπάντε)	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,9 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % ≤ 14,00 %
											≤ 1,1 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % > 14,00 %
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % ≤ 14,00 %
											≤ 1,1 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % > 14,00 %
5. Ελαιόλαδο αποτελο- ύμενο από εξευγενι- σμένο ελαιόλαδο και παρθένα ελαιόλαδα	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % ≤ 14,00 %
											≤ 1,0 εάν ολικό παλμιτικό οξύ % > 14,00 %

▼ M32

Κατηγορία	Σύσταση σε λιπαρά οξέα (1)						Ολικά ισομερή του trans-ελαϊκού οξέος (%)	Ολικά ισομερή του trans- λινελαϊκού + trans- λινολενικού οξέος (%)	Στιγμ- ασταδιένια (mg/kg) (2)	Διαφορά: μεταξύ ECN42 (HPLC) και ECN42 (θεωρητικός υπολογισμός)	2-μονοπαλμιτίνη (%)
	Μυριστικό (%)	Λινολενικό (%)	Αραχιδικό (%)	Εικοσενικό (%)	Βεχενικό (%)	Λιγνοκηρικό (%)					
6. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,60	≤ 1,4
7. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,4
8. Πυρηνέλαιο	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,2

(1) Περιεκτικότητα σε άλλα λιπαρά οξέα (%): παλμιτικό: 7,50-20,00· παλμιτελαϊκό: 0,30-3,50· δεκαεπτανικό: ≤ 0,40· δεκαεπτενικό: ≤ 0,60· στεατικό: 0,50-5,00· ελαϊκό: 55,00- 83,00· λινελαϊκό: 2,50-21,00.

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

Κατηγορία	Σύσταση σε στερόλες						Ολικές στερόλες (mg/kg)	Ερυθροδιόλη και ουβαόλη (%) (**)	Κηροί (mg/kg) (**)
	Χοληστερόλη (%)	Βρασ- ικαστερόλη (%)	Καμπεστε- ρόλη (1) (%)	Στιγμαστερόλη (%)	Φαινόμενη β- σιτοστερόλη (2) (%)	δ-7- στιγμαστενόλ- η (1) (%)			
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150
2. Παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150
3. Μειονεκτικό ελαιόλαδο (λαμ- πάντε)	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (3)	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 300 (3)
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350

▼ M32

Κατηγορία	Σύσταση σε στερόλες						Ολικές στερόλες (mg/kg)	Ερυθροδιόλη και ουβαόλη (%) (**)	Κηροί (mg/kg) (**)
	Χοληστερόλη (%)	Βρασ-ικαστερόλη (%)	Καμπεστε-ρόλη ⁽¹⁾ (%)	Στιγμαστερόλη (%)	Φαινόμενη β-σιτοστερόλη ⁽²⁾ (%)	δ-7-στιγμαστενόλη ⁽¹⁾ (%)			
5. Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένο ελαιόλαδο και παρθένα ελαιόλαδα	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ ⁽⁴⁾
7. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Πυρηνέλαιο	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

⁽¹⁾ Βλέπε προσάρτημα του παρόντος παραρτήματος.

⁽²⁾ Φαινόμενη β-σιτοστερόλη: δ-5,23-στιγμασταδιενόλη + κλεροστερόλη + β-σιτοστερόλη + σιτοστανόλη + δ-5-αβεναστερόλη + δ-5,24-στιγμασταδιενόλη.

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

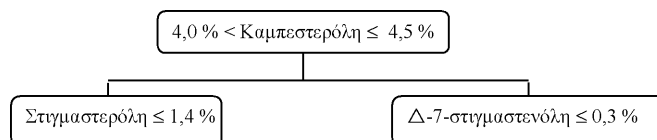
⁽⁴⁾ Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ακατέργαστα πυρηνέλαια, εάν η περιεκτικότητα σε ολικές αλειφατικές αλκοόλες υπερβαίνει τα 350 mg/kg και η εκατοστιαία αναλογία ερυθροδιόλης και ουβαόλης υπερβαίνει το 3,5 %.

Σημειώσεις:

- Τα αποτελέσματα των αναλύσεων πρέπει να εκφράζονται με τον αριθμό δεκαδικών ψηφίων που προβλέπεται για κάθε χαρακτηριστικό. Το τελευταίο αριθμητικό ψηφίο πρέπει να αυξάνεται κατά μία μονάδα, εάν το επόμενο ψηφίο είναι μεγαλύτερο από 4.
- Αρκεί έστω και ένα χαρακτηριστικό να μην ανταποκρίνεται στις αναγραφόμενες τιμές για να καταταχθεί το ελαιόλαδο σε άλλη κατηγορία ή να χαρακτηριστεί μη σύμφωνο για τους σκοπούς του παρόντος κανονισμού.
- Για το μειονεκτικό ελαιόλαδο, και τα δύο χαρακτηριστικά ποιότητας που σημειώνονται με αστερίσκο (*) μπορούν να διαφέρουν συγχρόνως από τα όρια που έχουν καθοριστεί για τη συγκεκριμένη κατηγορία.
- Τα χαρακτηριστικά που σημειώνονται με διπλό αστερίσκο (**) υποδηλώνουν ότι, για το ακατέργαστο πυρηνέλαιο, τα δύο σχετικά όρια μπορούν να διαφέρουν συγχρόνως από τις αναγραφόμενες τιμές. Για το πυρηνέλαιο και το εξευγενισμένο πυρηνέλαιο ένα από τα σχετικά όρια μπορεί να διαφέρει από τις αναγραφόμενες τιμές.

▼ **M32***Προσάρτημα***Δενδροδιαγράμματα αποφάσεων**

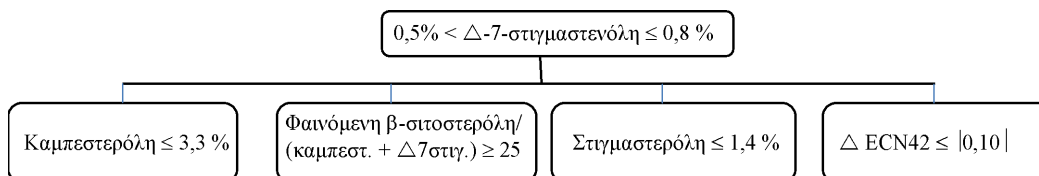
Δενδροδιάγραμμα αποφάσεων σχετικά με την **καμπεστερόλη** για παρθένα και εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα:



Οι άλλες παράμετροι συμμορφώνονται με τα όρια του παρόντος κανονισμού.

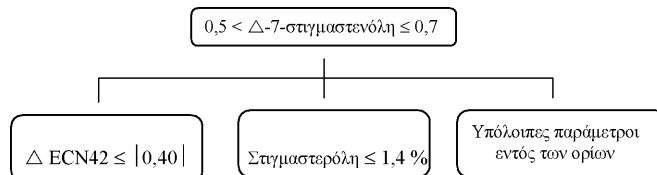
Δενδροδιάγραμμα αποφάσεων σχετικά με τη **Δ-7-στιγμαστενόλη** για:

— Εξαιρετικά παρθένα και παρθένα ελαιόλαδα



Οι άλλες παράμετροι συμμορφώνονται με τα όρια του παρόντος κανονισμού.

— Πυρηνέλαια (ακατέργαστα και εξευγενισμένα)



Οι άλλες παράμετροι συμμορφώνονται με τα όρια του παρόντος κανονισμού.

▼ **M26***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ια***ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ Ή ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΟΥ ΠΟΥ ΠΑΡΑΔΙΔΟΝΤΑΙ ΣΕ ΑΜΕΣΕΣ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΕΣ**

Η παρούσα μέθοδος δειγματοληψίας εφαρμόζεται σε παρτίδες ελαιολάδου ή πυρηνελαίου σε άμεσες συσκευασίες. Ισχύουν διαφορετικές μέθοδοι δειγματοληψίας ανάλογα με το αν η περιεκτικότητα της άμεσης συσκευασίας υπερβαίνει τα 5 λίτρα ή όχι.

Ως «παρτίδα» νοείται ένα σύνολο μονάδων πώλησης που παράγονται, μεταποιούνται και συσκευάζονται σε τέτοιες συνθήκες ώστε το έλαιο που περιέχει καθεμία από αυτές τις μονάδες πώλησης να θεωρείται ομοιογενές ως προς όλα τα αναλυτικά χαρακτηριστικά. Οι παρτίδες πρέπει να ταυτοποιούνται σύμφωνα με την οδηγία 2011/91/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου ⁽¹⁾.

Ως «στοιχειώδες δείγμα» νοείται η ποσότητα ελαίου που περιέχεται σε μια άμεση συσκευασία και λαμβάνεται από τυχαίο σημείο της παρτίδας.

1. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΟΥ ΒΑΣΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**1.1. Άμεση συσκευασία με χωρητικότητα που δεν υπερβαίνει τα 5 λίτρα**

Ως «βασικό δείγμα», προκειμένου για άμεση συσκευασία με χωρητικότητα που δεν υπερβαίνει τα 5 λίτρα, νοείται ο αριθμός των στοιχειωδών δειγμάτων που λαμβάνονται από μια παρτίδα και σύμφωνα με τον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Το ελάχιστο μέγεθος βασικού δείγματος πρέπει να είναι το εξής

Όταν η χωρητικότητα της άμεσης συσκευασίας είναι	Το βασικό δείγμα πρέπει να είναι το έλαιο που περιέχεται
α) 1 λίτρο ή μεγαλύτερη	α) σε 1 άμεση συσκευασία
β) μικρότερη από 1 λίτρο	β) στον ελάχιστο αριθμό συσκευασιών με συνολική χωρητικότητα τουλάχιστον 1,0 λίτρου

Κάθε κράτος μέλος δύναται να αυξάνει τον αριθμό των συσκευασιών που αναφέρονται στον πίνακα 1 και συνιστούν ένα βασικό δείγμα, ανάλογα με τις ανάγκες του (για παράδειγμα, οργανοληπτική εξέταση από διαφορετικό εργαστήριο από αυτό που διενήργησε τις χημικές αναλύσεις, κατ' έφεση ανάλυση κ.λπ.).

1.2. Άμεση συσκευασία με χωρητικότητα που υπερβαίνει τα 5 λίτρα

Ως «βασικό δείγμα», προκειμένου για άμεση συσκευασία με χωρητικότητα που υπερβαίνει τα 5 λίτρα, νοείται ένα αντιπροσωπευτικό μέρος του συνόλου των στοιχειωδών δειγμάτων, λαμβανόμενο με διαδικασία μείωσης και σύμφωνα με τον πίνακα 2. Το βασικό δείγμα πρέπει να αποτελείται από διάφορα αντιπροσωπευτικά δείγματα.

Ως «αντιπροσωπευτικό δείγμα» βασικού δείγματος νοείται καθεμία από τις συσκευασίες που απαρτίζουν το βασικό δείγμα.

Πίνακας 2

Ελάχιστος αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να επιλέγονται

Αριθμός συσκευασιών στην παρτίδα	Ελάχιστος αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να επιλέγονται
Έως 10	1
Από ... 11 έως 150	2

⁽¹⁾ Οδηγία 2011/91/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 13ης Δεκεμβρίου 2011, σχετικά με τις ενδείξεις ή τα σήματα που επιτρέπουν την αναγνώριση της παρτίδας στην οποία ανήκει ένα τρόφιμο (ΕΕ L 334 της 16.12.2011, σ. 1).

▼ **M26**

Αριθμός συσκευασιών στην παρτίδα	Ελάχιστος αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να επιλέγονται
Από ... 151 έως 500	3
Από ... 501 έως 1 500	4
Από ... 1 501 έως 2 500	5
> 2 500 ανά 1 000 συσκευασίες	1 επιπλέον στοιχειώδες δείγμα

Προκειμένου να μειωθεί ο όγκος των δειγματιζόμενων άμεσων συσκευασιών, το περιεχόμενο των στοιχειωδών δειγμάτων ομοιογενοποιείται για την παρασκευή του βασικού δείγματος. Τα τμήματα περιεχομένου των διαφορετικών στοιχειωδών δειγμάτων τοποθετούνται σε κοινό δοχείο για ομοιογενοποίηση με ανάδευση, ώστε να προστατεύονται όσο το δυνατόν καλύτερα από τον αέρα.

Το περιεχόμενο του βασικού δείγματος πρέπει να τοποθετείται σε σειρά συσκευασιών με την ελάχιστη χωρητικότητα του 1,0 λίτρου, καθεμία από τις οποίες αποτελεί αντιπροσωπευτικό δείγμα βασικού δείγματος.

Κάθε κράτος μέλος δύναται να αυξάνει τον αριθμό των βασικών δειγμάτων, ανάλογα με τις ανάγκες του (για παράδειγμα, οργανοληπτική εξέταση από διαφορετικό εργαστήριο από αυτό που διενήργησε τις χημικές αναλύσεις, κατ' έφεση ανάλυση κ.λπ.).

Κάθε συσκευασία πρέπει να πληρούται κατά τρόπο που ελαχιστοποιεί το στρώμα αέρα στο πάνω μέρος της και, στη συνέχεια, να κλείνεται κατάλληλα και να σφραγίζεται ώστε να διασφαλίζεται ο αλύμαντος προϊόντος.

Αυτά τα αντιπροσωπευτικά δείγματα πρέπει να επισημαίνονται προκειμένου να εξασφαλίζεται η ορθή ταυτοποίησή τους.

2. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

▼ **M32**

- 2.1. Κάθε βασικό δείγμα πρέπει να χωρίζεται σε εργαστηριακά δείγματα, σύμφωνα με το σημείο 2.5 του προτύπου EN ISO 5555, και να υποβάλλεται σε ανάλυση με τη σειρά που εμφανίζεται στο διάγραμμα ροής του παραρτήματος Ιβ ή με οποιαδήποτε άλλη τυχαία σειρά.

▼ **M26**

- 2.2. Εάν όλα τα αποτελέσματα των αναλύσεων συμφωνούν με τα χαρακτηριστικά της δηλωθείσας κατηγορίας ελαίου, ολόκληρη η παρτίδα θεωρείται σύμφωνη.

Εάν έστω και ένα αποτέλεσμα των αναλύσεων δεν συμφωνεί με τα χαρακτηριστικά της δηλωθείσας κατηγορίας ελαίου, ολόκληρη η παρτίδα θεωρείται μη σύμφωνη.

3. ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑΣ ΤΗΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ

- 3.1. Προκειμένου να επαληθευθεί η κατηγορία της παρτίδας, η αρμόδια αρχή μπορεί να αυξήσει τον αριθμό των βασικών δειγμάτων που λαμβάνονται από διάφορα σημεία της παρτίδας σύμφωνα με τον επόμενο πίνακα:

Πίνακας 3

Αριθμός βασικών δειγμάτων καθοριζόμενος από το μέγεθος της παρτίδας

Μέγεθος της παρτίδας (λίτρα)	Αριθμός βασικών δειγμάτων
Λιγότερα από 7 500	2
7 500 έως λιγότερα από 25 000	3
25 000 έως λιγότερα από 75 000	4
75 000 έως λιγότερα από 125 000	5
125 000 ή περισσότερα	6 + 1 για κάθε επιπλέον 50 000 λίτρα

▼ M26

Κάθε στοιχειώδες δείγμα που αποτελεί μέρος του βασικού δείγματος πρέπει να λαμβάνεται από μη διακριτή θέση της παρτίδας· είναι απαραίτητο να σημειώνεται η θέση κάθε βασικού δείγματος και να ταυτοποιείται με σαφήνεια.

Κάθε βασικό δείγμα πρέπει να σχηματίζεται σύμφωνα με τις διαδικασίες που αναφέρονται στα σημεία 1.1 και 1.2.

Στη συνέχεια, κάθε βασικό δείγμα υποβάλλεται στις αναλύσεις που αναφέρονται στο άρθρο 2 παράγραφος 1.

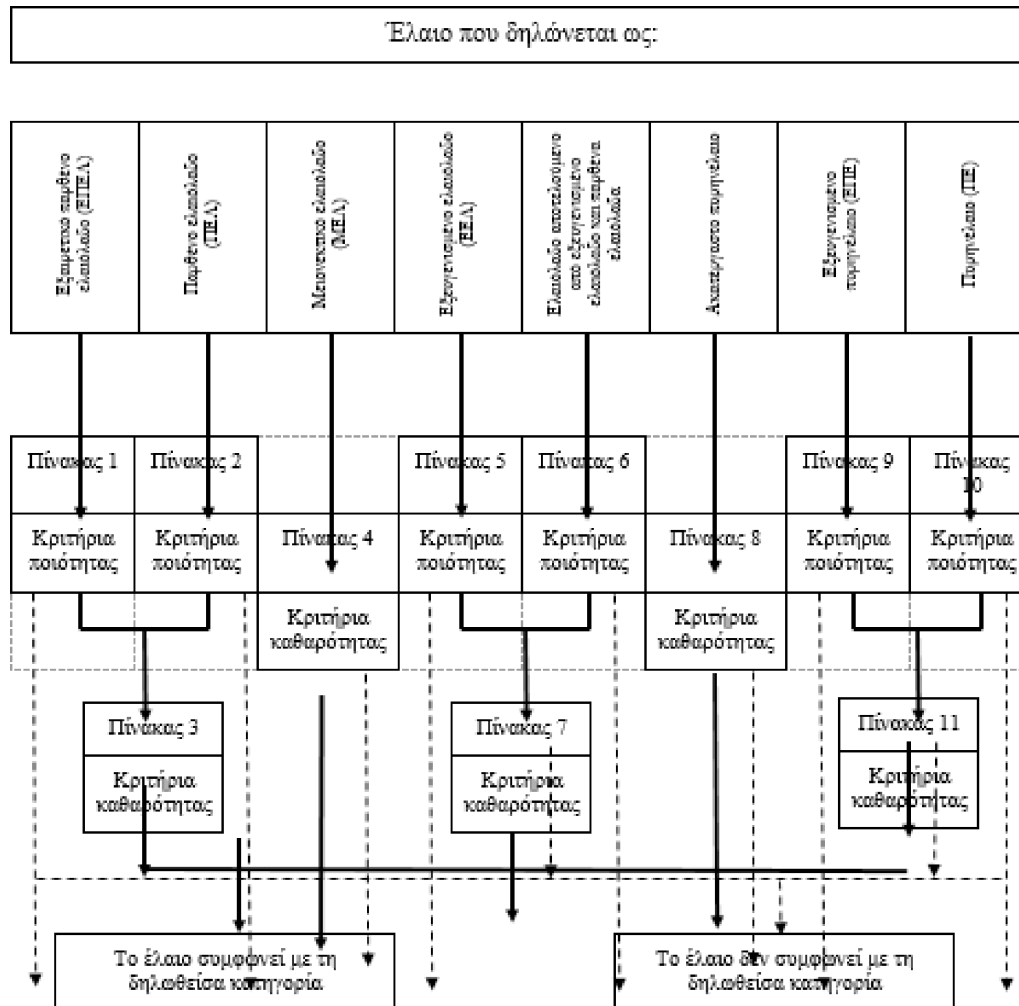
- 3.2. Όταν ένα από τα αποτελέσματα των αναφερόμενων στο άρθρο 2 παράγραφος 1 αναλύσεων ενός τουλάχιστον βασικού δείγματος δεν συμφωνεί με τα χαρακτηριστικά της δηλωθείσας κατηγορίας ελαίου, ολόκληρη η παρτίδα δειγματοληψίας θεωρείται μη σύμφωνη.

▼ M32

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ιβ

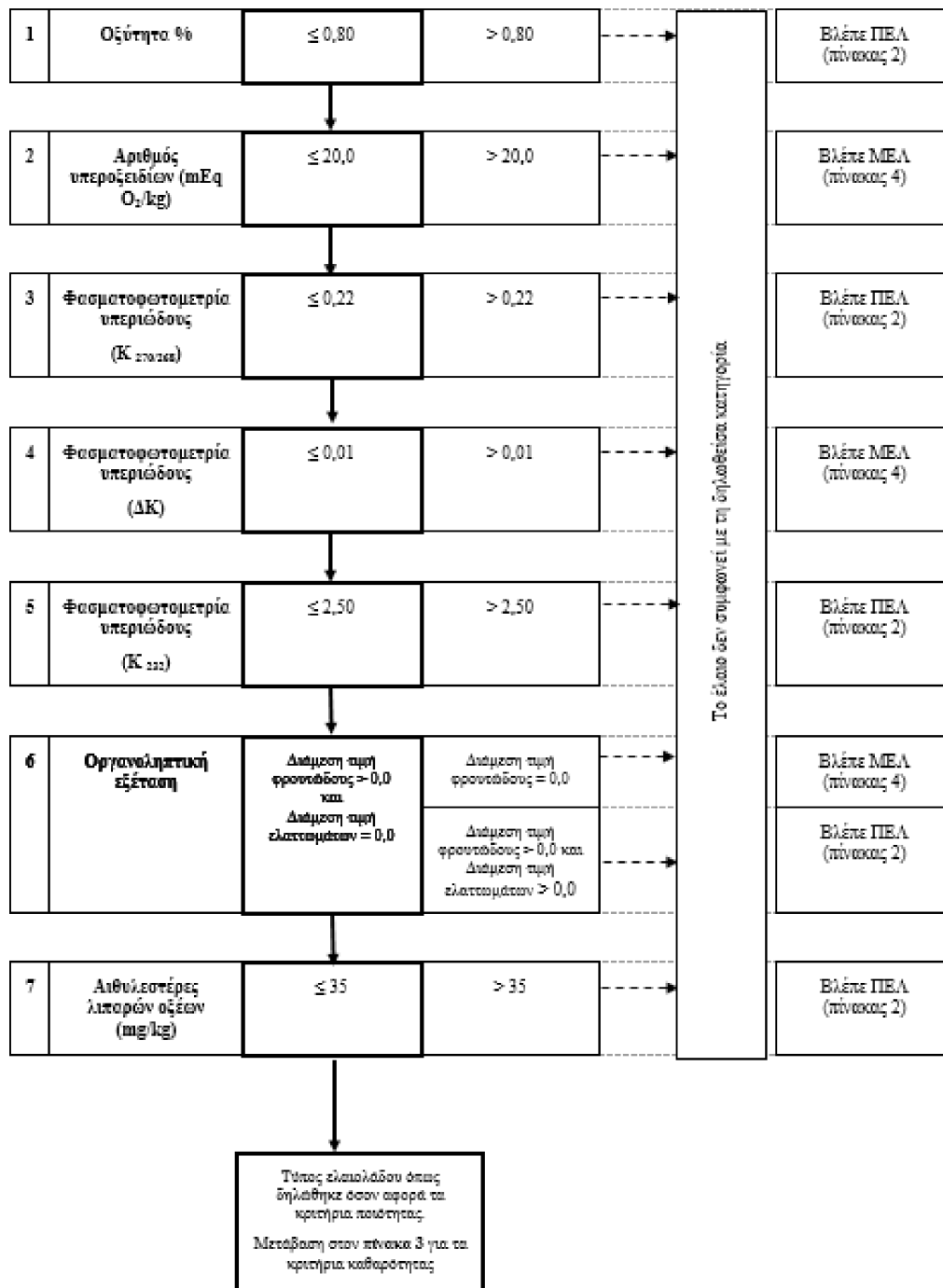
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΚΡΙΒΩΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΦΩΝΙΑΣ
ΕΝΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΤΗ ΔΗΛΩΘΕΙΣΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ

Γενικός πίνακας



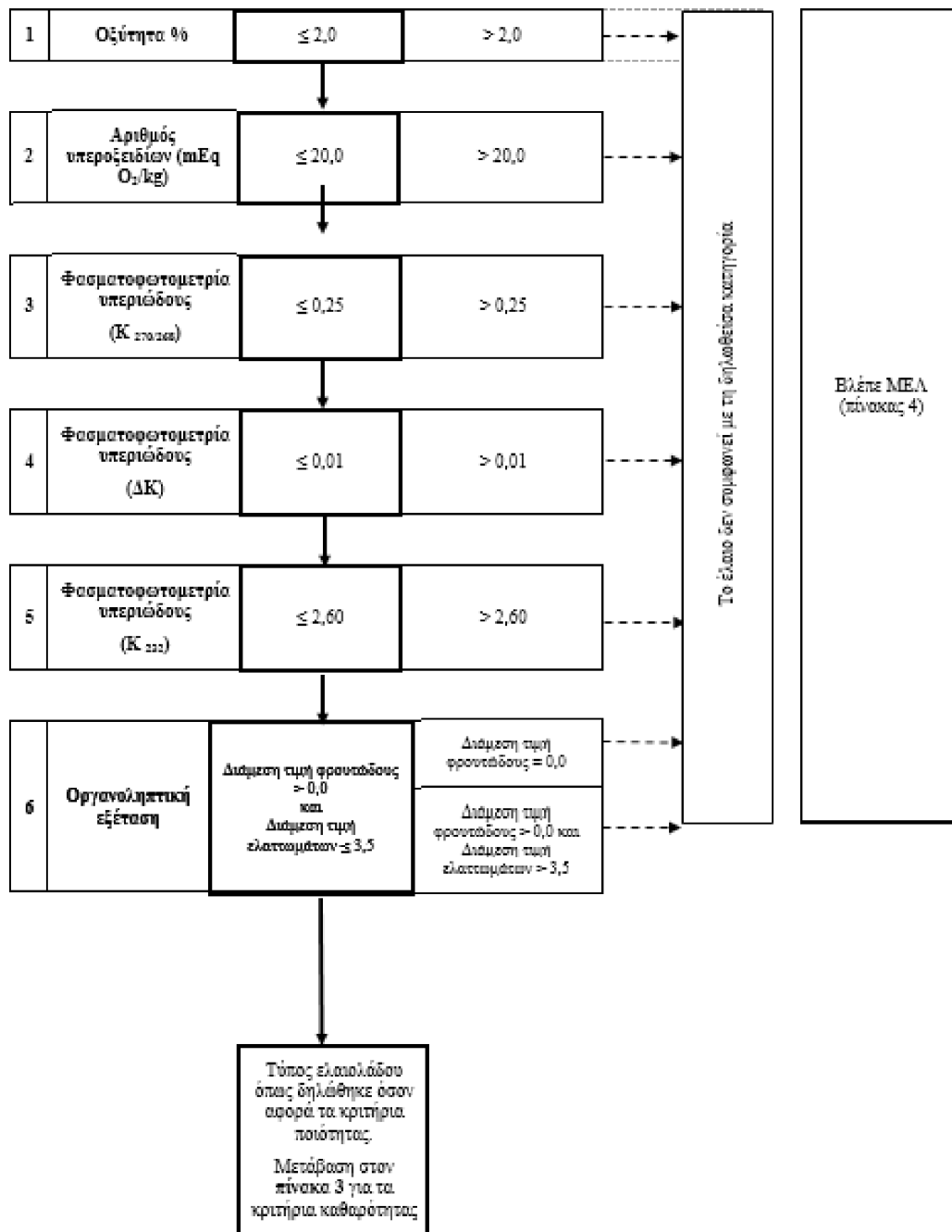
▼ M32

Πίνακας 1 — Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο — Κριτήρια ποιότητας



▼ M32

Πίνακας 2 — Παρθένο ελαιόλαδο — Κριτήρια ποιότητας



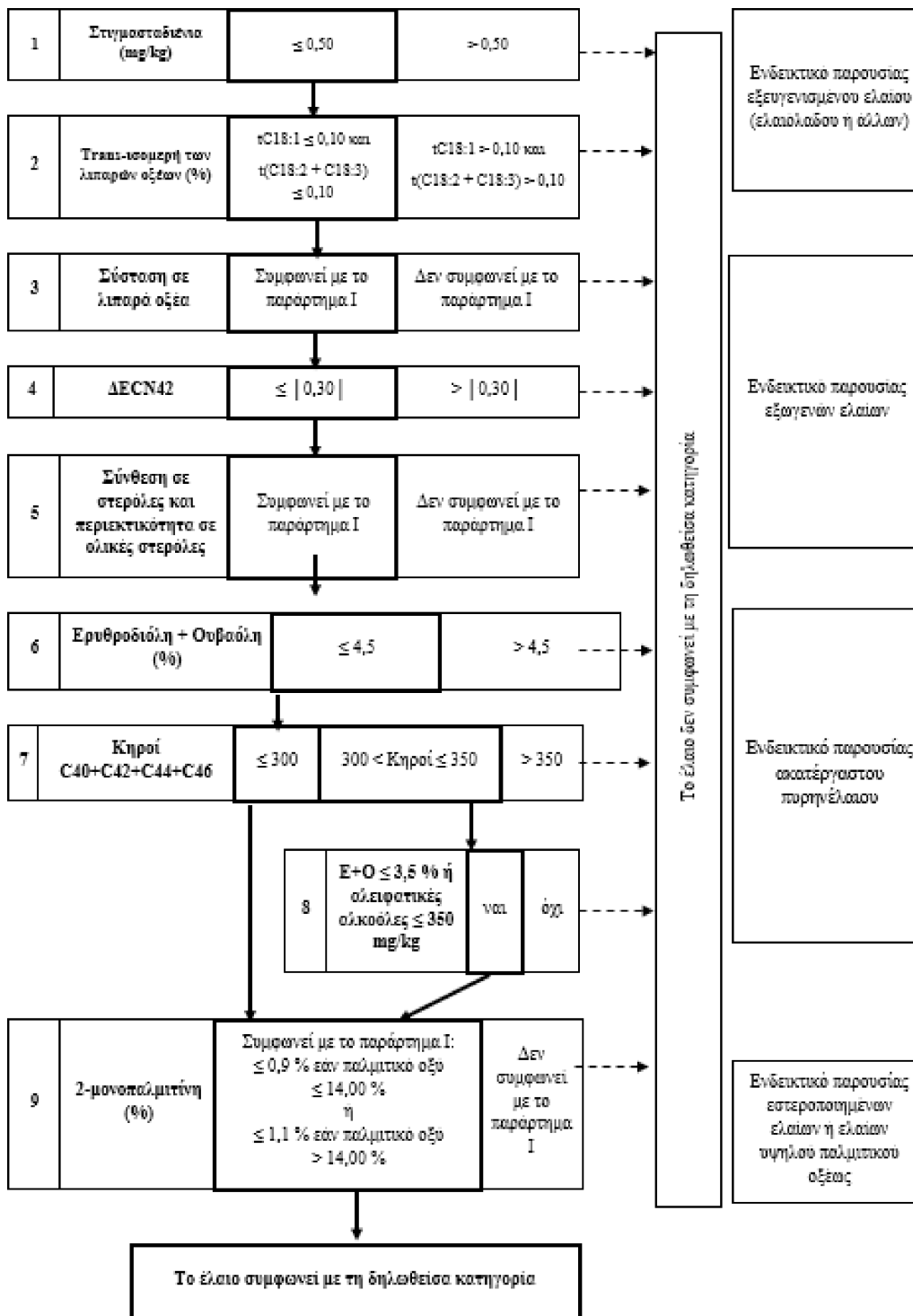
▼ M32

Πίνακας 3 — Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και παρθένο ελαιόλαδο — Κριτήρια καθαρότητας

1	Στιγμαστοδιένια (mg/kg)	$\leq 0,05$	$> 0,05$	Το έλαιο δεν συμφωνεί με τη δηλωθείσα κατηγορία	Ενδεικτικό παρουσίας εξευγενισμένου ελαίου (ελαιόλαδου ή άλλων)
2	Trans-ισομερή των λιπαρών οξέων (%)	$tC18:1 \leq 0,05$ και $t(C18:2 + C18:3) \leq 0,05$	$tC18:1 > 0,05$ ή $t(C18:2 + C18:3) > 0,05$		Ενδεικτικό παρουσίας εξευγενισμένου ελαίου (ελαιόλαδου ή άλλων)
3	Σύσταση σε λιπαρά οξέα	Συμφωνεί με το παράρτημα I	Δεν συμφωνεί με το παράρτημα I		Ενδεικτικό παρουσίας εξωγενών ελαίων
4	ΔECN42	$\leq 0,20 $	$> 0,20 $		Ενδεικτικό παρουσίας εξωγενών ελαίων
5	Σύνθεση σε στερόλες και περιεκτικότητα σε ολικές στερόλες	Συμφωνεί με το παράρτημα I	Δεν συμφωνεί με το παράρτημα I		Ενδεικτικό παρουσίας εξωγενών ελαίων
6	Ερυθροδιόλη + Ουβαόλη (%)	$\leq 4,5$	$> 4,5$		Ενδεικτικό παρουσίας πυρηνέλαιου
7	Κηροί (mg/kg) C42+C44+C46	≤ 150	> 150		Ενδεικτικό παρουσίας πυρηνέλαιου
8	2-μονοπαλμιτίνη (%)	Συμφωνεί με το παράρτημα I: $\leq 0,9$ % εάν παλμιτικό οξύ $\leq 14,00$ % ή $\leq 1,0$ % εάν παλμιτικό οξύ $> 14,00$ %	Δεν συμφωνεί με το παράρτημα I		Ενδεικτικό παρουσίας εστεροποιημένων ελαίων ή ελαίων υψηλού παλμιτικού οξέως
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;">Το έλαιο συμφωνεί με τη δηλωθείσα κατηγορία</div>					

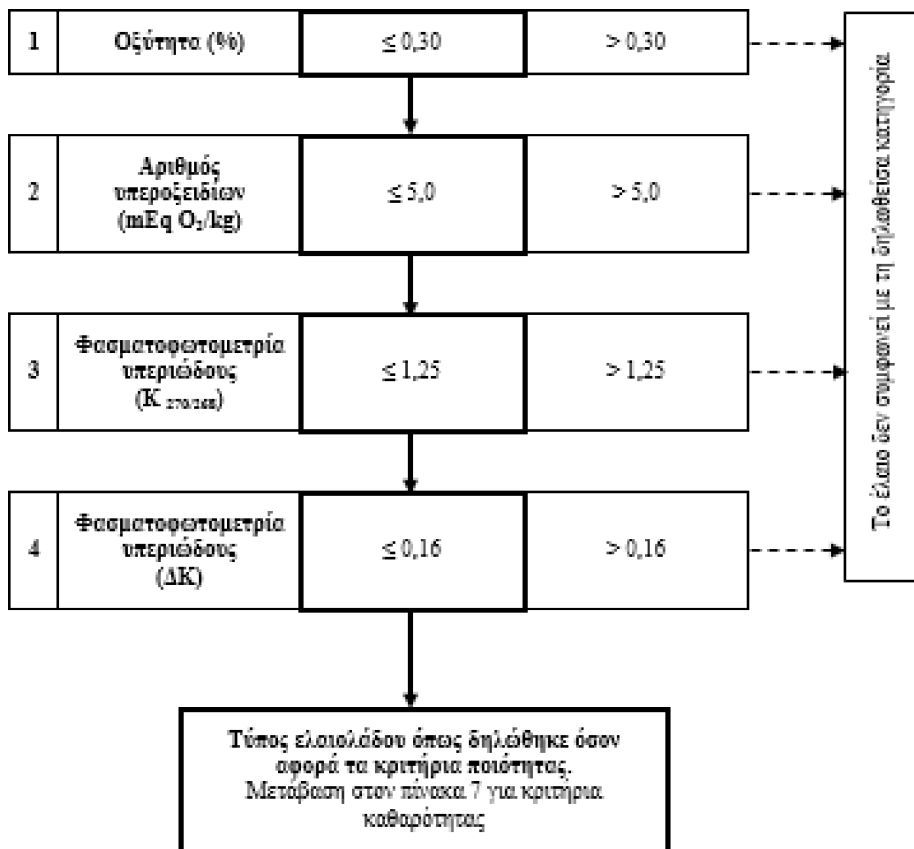
▼ M32

Πίνακας 4 — Μειονεκτικό ελαιόλαδο — Κριτήρια καθαρότητας

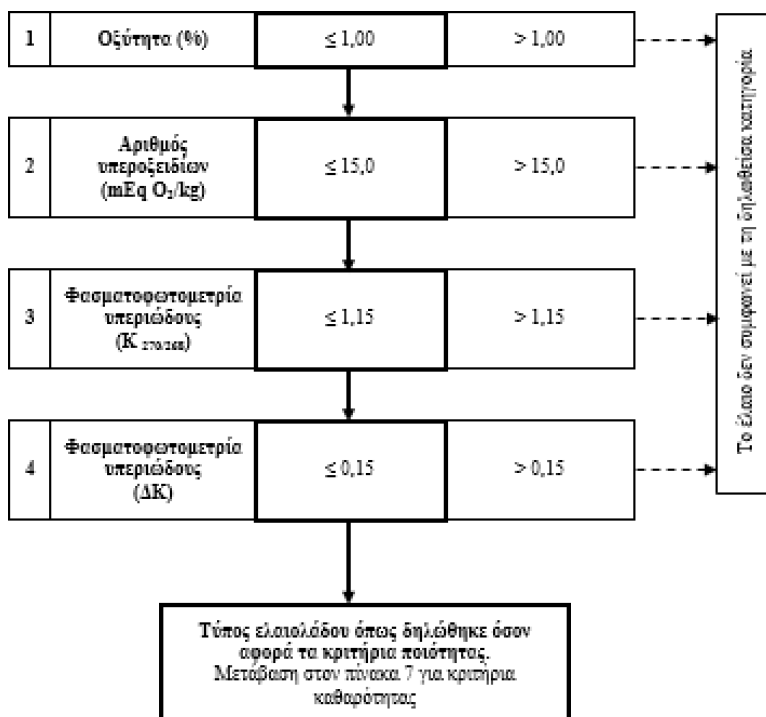


▼ M32

Πίνακας 5 — Εξευγενισμένο ελαιόλαδο — Κριτήρια ποιότητας

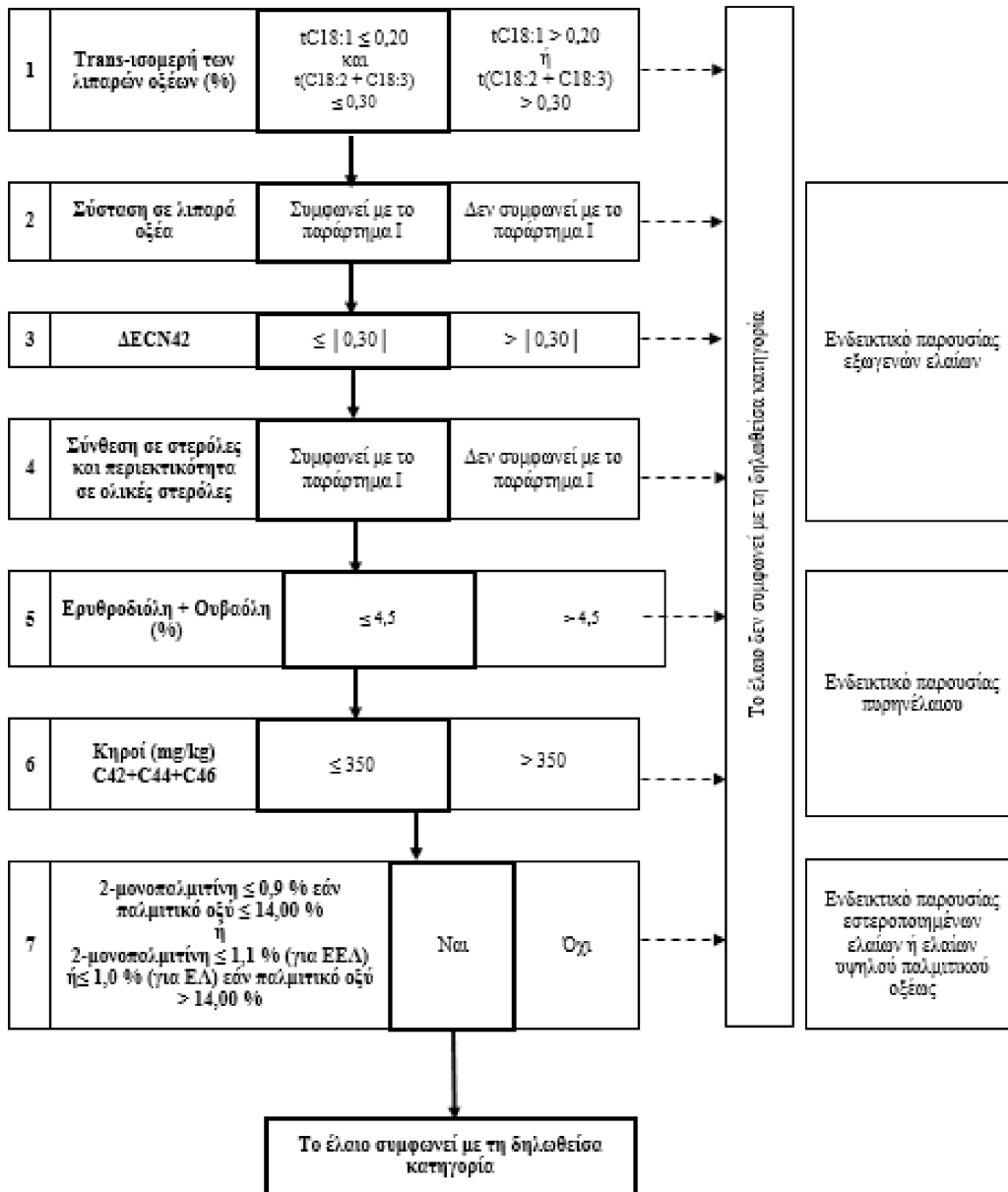


Πίνακας 6 — Ελαιόλαδο (αποτελούμενο από εξευγενισμένο ελαιόλαδο και παρθένα ελαιόλαδα) — Κριτήρια ποιότητας



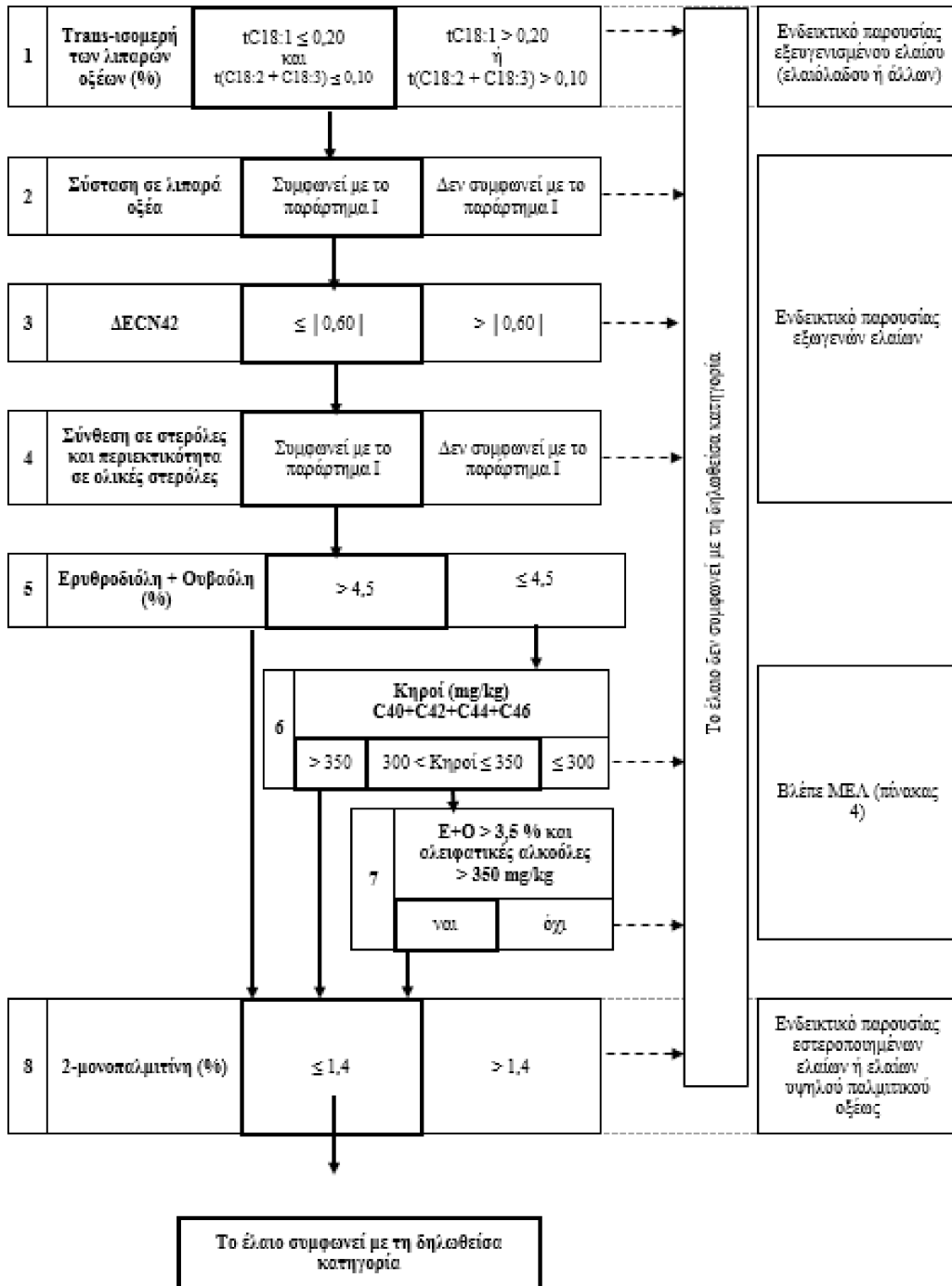
▼ M32

Πίνακας 7 — Εξευγενισμένο ελαιόλαδο και ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένο ελαιόλαδο και παρθένα ελαιόλαδα — Κριτήρια καθαρότητας



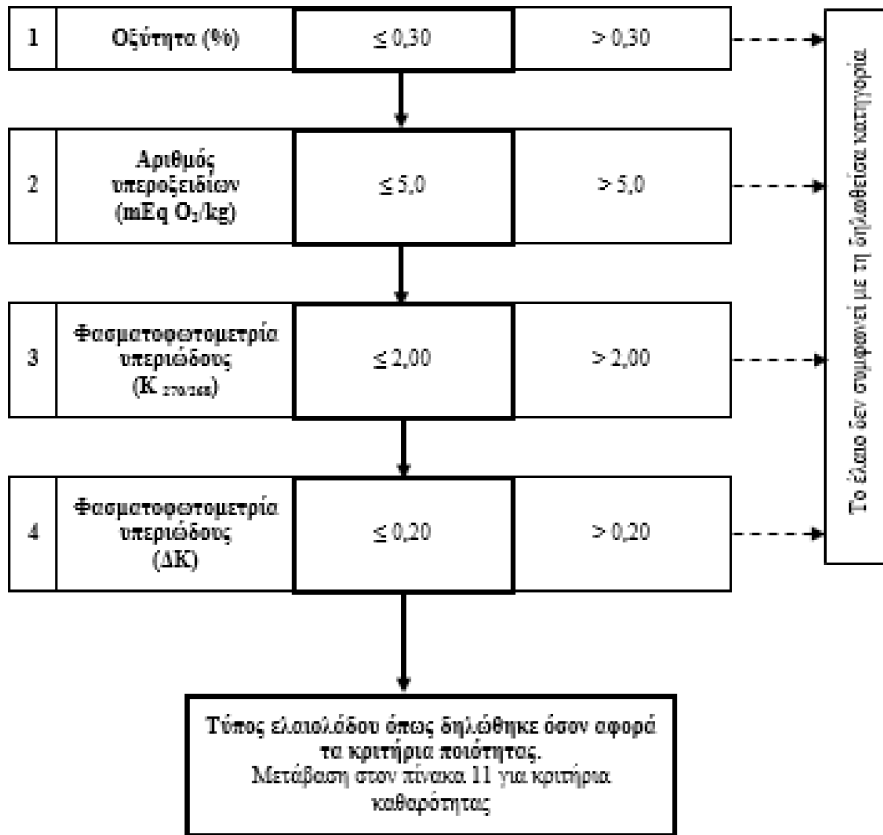
▼ M32

Πίνακας 8 — Ακατέργαστο πυρηνέλαιο — Κριτήρια καθαρότητας

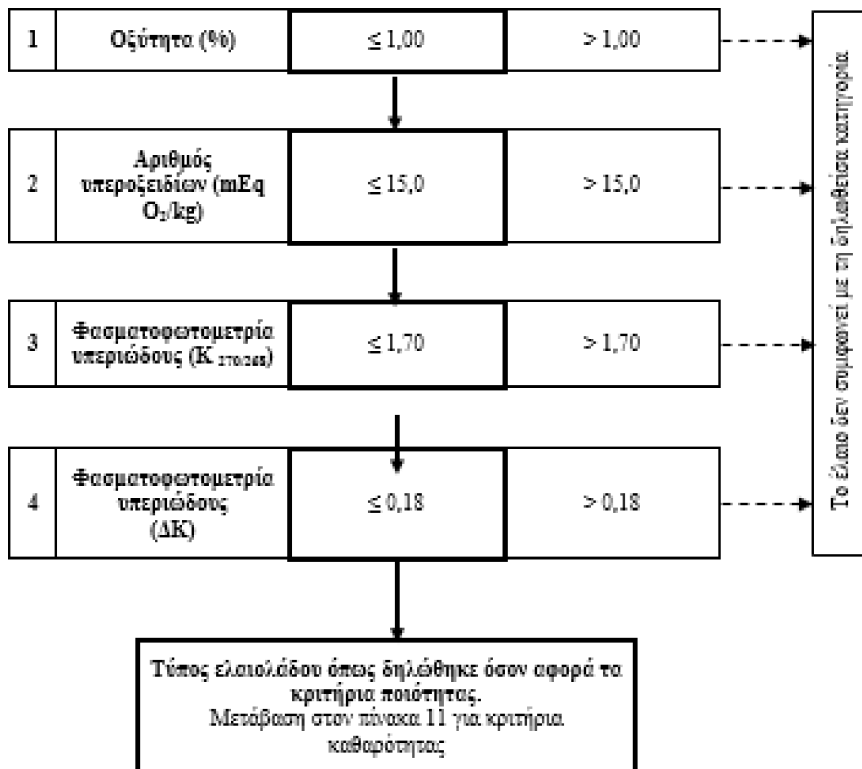


▼ M32

Πίνακας 9 — Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο — Κριτήρια ποιότητας

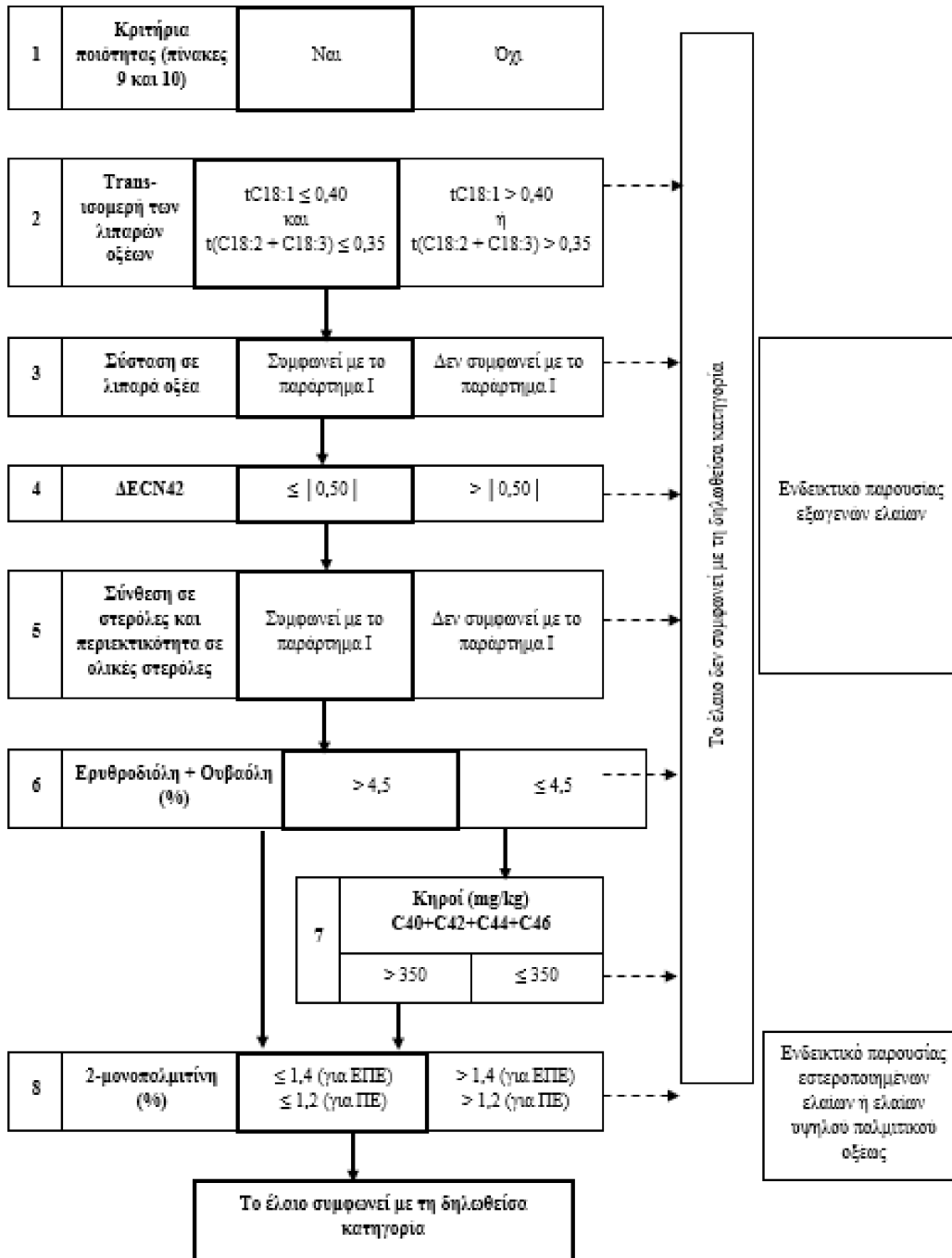


Πίνακας 10 — Πυρηνέλαιο — Κριτήρια ποιότητας



▼ M32

Πίνακας 11 — Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο και πυρηνέλαιο — Κριτήρια καθαρότητας



▼ **M29****ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ****ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ, ΕΝ ΨΥΧΡΩ ΜΕΘΟΔΟΣ****1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Η παρούσα μέθοδος περιγράφει τον προσδιορισμό των ελευθέρων λιπαρών οξέων του ελαιολάδου και των πυρηνελαιίων. Η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα εκφράζεται ως οξύτητα και υπολογίζεται ως το ποσοστό ελαϊκού οξέος.

2. ΑΡΧΗ

Διαλύεται το δείγμα σε μείγμα διαλυτών και τα περιεχόμενα ελεύθερα λιπαρά οξέα τιτλοδοτούνται, χρησιμοποιώντας διάλυμα υδροξειδίου του καλίου ή διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

3.1. Διαθυλαιθέρας: αιθανόλη 95 % (v/v), σε μείγμα ίσων όγκων.

Εξουδετερώνεται ακριβώς τη στιγμή χρησιμοποίησής του με το διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (3.2), με την προσθήκη 0,3 ml διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης (3.3) ανά 100 ml μείγματος.

Σημείωση 1: Ο διαθυλαιθέρας είναι εξαιρετικά εύφλεκτος και μπορεί να σχηματίζει εκρηκτικά υπεροξειδία. Θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα κατά τη χρήση του.

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

3.2. Υδροξείδιο του καλίου ή υδροξείδιο του νατρίου, τιτλοδοτημένο αιθανολικό ή υδατικό διάλυμα, c(KOH) (ή c(NaOH)) περίπου 0,1 mol/l ή, εάν χρειαστεί, c(KOH) (ή c(NaOH)) περίπου 0,5 mol/l. Υπάρχουν στο εμπόριο διαλύματα έτοιμα προς χρήση.

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

Εάν παρατηρείται διαχωρισμός φάσεων όταν χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (ή υδροξειδίου του νατρίου), το υδατικό διάλυμα αντικαθίσταται με αιθανολικό διάλυμα.

Σημείωση 3: Ένα σταθερό άχρωμο διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (ή υδροξειδίου του νατρίου) μπορεί να παρασκευαστεί ως εξής: Φέρονται σε βρασμό 1 000 ml αιθανόλης ή νερού που περιέχει 8 g υδροξειδίου του καλίου (ή υδροξειδίου του νατρίου) και 0,5 g ρινισμάτων αργιλίου και συνεχίζεται επί μία ώρα ο βρασμός με κάθετο ψυκτήρα. Εκτελείται αμέσως διήθηση. Διαλύεται μέσα στο απόσταγμα η απαιτούμενη ποσότητα υδροξειδίου του καλίου (ή υδροξειδίου του νατρίου). Αφήνονται επί αρκετές ημέρες και το διαυγές υπερκείμενο υγρό διαχωρίζεται με έκχυση από το ίζημα ανθρακικού καλίου (ή ανθρακικού νατρίου).

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

▼ **M29**

3.3. Φαινολοφθαλεΐνη, διάλυμα 10 g/l σε αιθανόλη 95 έως 96 % (v/v) ή κυανού αλκαλίων 6B ή θυμολοφθαλεΐνη, διάλυμα 20 g/l σε αιθανόλη 95 έως 96 % (v/v). Στην περίπτωση ελαίων έντονου χρώματος, χρησιμοποιείται κυανού αλκαλίων ή θυμολοφθαλεΐνη.

4. ΟΡΓΑΝΑ

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός που περιλαμβάνει:

4.1. Αναλυτικό ζυγό

4.2. Κωνική φιάλη των 250 ml.

4.3. Προχοΐδα των 10 ml, κατηγορίας A, βαθμονομημένη ανά 0,05 ml ή ισοδύναμη αυτόματη προχοΐδα.

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1. Παρασκευή δείγματος προς ανάλυση

Όταν το δείγμα είναι θολό, πρέπει να διηθείται.

5.2. Ποσότητα του δείγματος δοκιμής

Λαμβάνεται δείγμα ανάλογα με την αναμενόμενη οξύτητα, σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Αναμενόμενη οξύτητα (Ελαϊκό οξύ g/100g)	Μάζα δείγματος (g)	Ακρίβεια ζύγισης (g)
0 έως 2	10	0,02
> 2 έως 7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Το δείγμα ζυγίζεται στην κωνική φιάλη (4.2).

5.3. Προσδιορισμός

Το δείγμα (5.2) διαλύεται σε 50 έως 100 ml του προηγούμενα εξουδετερωμένου μείγματος διαιθυλαιθέρος και αιθανόλης (3.1).

Τιτλοδότηση με ταυτόχρονη ανάδευση με το διάλυμα 0,1 mol/l υδροξειδίου του καλίου (ή υδροξειδίου του νατρίου) (3.2) (βλέπε σημείωση 4) έως ότου αλλάξει χρώμα ο δείκτης (το χρώμα του έγχρωμου δείκτη επικρατεί επί τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα).

Σημείωση 4: Εάν η ποσότητα του διαλύματος υδροξειδίου του καλίου 0,1 mol/l (ή του διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου) που απαιτείται υπερβαίνει τα 10 ml, χρησιμοποιείται διάλυμα 0,5 mol/l ή μεταβάλλεται η μάζα του δείγματος σύμφωνα με την αναμενόμενη ελεύθερη οξύτητα και τον προτεινόμενο πίνακα.

Σημείωση 5: Εάν το διάλυμα θολώνει κατά την ογκομέτρηση/τιτλοδότηση, προστίθεται ικανοποιητική ποσότητα μείγματος διαλυτών (3.1) προκειμένου να επιτευχθεί διαυγές διάλυμα.

Πραγματοποιείται δεύτερος προσδιορισμός μόνον εάν το πρώτο αποτέλεσμα είναι υψηλότερο από το καθορισμένο όριο για την κατηγορία του ελαίου.

▼ M29

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

$$V \times c \times \frac{M}{1\,000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

όπου:

V = είναι ο όγκος σε χιλιοστόλιτρα, του τιτλοδοτημένου διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (ή διαλύματος του υδροξειδίου του νατρίου) που έχει χρησιμοποιηθεί,

c = είναι η ακριβής συγκέντρωση σε moles ανά λίτρο, του τιτλοδοτημένου διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (ή υδροξειδίου του νατρίου) που έχει χρησιμοποιηθεί·

M = 282 g/mol, είναι το γραμμομοριακό βάρος, σε γραμμάρια ανά mole, του ελαϊκού οξέος·

m = είναι η μάζα του δείγματος δοκιμής, σε γραμμάρια.

Η ελαϊκή οξύτητα καταχωρίζεται ως εξής:

α) με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων για τις τιμές από 0 έως και 1·

β) με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου για τις τιμές από 1 έως και 100.

▼ **M30****ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ****ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΩΝ****1. Πεδίο εφαρμογής**

Το παρόν παράρτημα περιγράφει μια μέθοδο για τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων των ζωικών και φυτικών ελαίων και λιπών.

2. Ορισμός

Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφράζει την ποσότητα αυτών των ουσιών στο δείγμα, εκφραζόμενη σε χλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά χιλιόγραμμα, που οξειδώνουν το ιωδιούχο κάλιο υπό τις συνθήκες λειτουργίας που περιγράφονται.

3. Βασική αρχή

Επεξεργασία του δείγματος δοκιμής, σε διάλυμα σε οξικό οξύ και χλωροφόρμιο, με διάλυμα ιωδιούχου καλίου. Τίτλοδοσή του ιωδίου που ελευθερώθηκε με τυποποιημένο διάλυμα θειοθειικού νατρίου.

4. Εξοπλισμός

Όλος ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι απαλλαγμένος από αναγωγικές ή οξειδωτικές ουσίες.

Σημείωση 1: Να μην λιπαίνονται οι εσφυρισμένες επιφάνειες.

4.1. Γυάλινο scoop των 3 ml.

4.2. Φιάλες με λαμό εσφυρισμένης υάλου και πώματα, χωρητικότητας περίπου 250 ml, οι οποίες προηγουμένως έχουν ξηρανθεί και στις οποίες έχει διαβιβασθεί αδρανές αέριο (άζωτο ή, προτιμότερα, διοξείδιο του άνθρακα).

4.3. Προχοΐδα των 5 ml, 10 ml ή 25 ml, βαθμονομημένη ανά τουλάχιστον 0,05 ml, κατά προτίμηση, με αυτόματη μηδενική προσαρμογή ή ισοδύναμη αυτόματη προχοΐδα

4.4. Αναλυτικός ζυγός.

5. Αντιδραστήρια

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

5.2. Παγόμορφο οξικό οξύ, αναλυτικής καθαρότητας, απαλλαγμένο οξυγόνου με διοχέτευση υπό πίεση, μέσα από αυτό, ρεύματος καθαρού, ξηρού αδρανούς αερίου.

5.3. Ιωδιούχο κάλιο, κορεσμένο υδατικό διάλυμα, πρόσφατα παρασκευασμένο, απαλλαγμένο από ιώδιο και ιωδικά. Διαλύονται περίπου 14 g ιωδιούχου καλίου σε 10 ml νερού θερμοκρασίας δωματίου.

5.4. Θειοθειικό νάτριο, 0,01 mol/l (ισοδύναμο 0,01 N) ακριβώς τυποποιημένο υδατικό διάλυμα, αμέσως πριν από τη χρήση.

Παρασκευάζεται καθημερινώς διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,01 mol/l από τυποποιημένο διάλυμα 0,1 mol/l θειοθειικού νατρίου πριν από τη χρήση ή καθορίζεται η ακριβής μοριακότητα. Όπως δείχνει η πείρα, η σταθερότητα είναι περιορισμένη και εξαρτάται από την τιμή του pH και την περιεκτικότητα σε ελεύθερο διοξείδιο του άνθρακα. Χρήση μόνο φρεσκοβρασμένου νερού για την αραιώση, που ενδεχομένως πληρούται με άζωτο.

Συνιστάται η ακόλουθη διαδικασία για τον προσδιορισμό της ακριβούς μοριακότητας του διαλύματος θειοθειικού νατρίου:

▼ **M30**

Ζυγίζονται, με ακρίβεια 0,001 g, 0,27 g έως 0,33 g ιωδικού καλίου (m_{KIO_3}) σε ογκομετρική φιάλη (των 250 ml ή 500 ml), προστίθεται φρεσκοβρασμένο νερό μέχρι τη χαραγή (V_2) και το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη βοήθεια σιφωνίου, μεταφέρονται 5 ml ή 10 ml αυτού του διαλύματος ιωδικού καλίου (V_1) σε φιάλη Erlenmeyer των 250 ml. Προστίθενται 60 ml φρεσκοβρασμένου νερού, 5 ml διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 4 mol/l και 25 mg έως 50 mg ιωδιούχου καλίου ή 0,5 ml του κορεσμένου διαλύματος ιωδιούχου καλίου. Το διάλυμα τιτλοδοτείται με θειοθειικό νάτριο (V_3) για να προσδιοριστεί η ακριβής μοριακότητα του διαλύματος θειοθειικού νατρίου.

$$T = \frac{m_{\text{KIO}_3} \times V_1 \times 6 \times 10 \times w_{\text{KIO}_3}}{M_{\text{KIO}_3} \times V_2 \times V_3}$$

όπου:

m_{KIO_3} είναι η μάζα του ιωδικού καλίου, σε γραμμάρια

V_1 είναι ο όγκος του διαλύματος ιωδικού καλίου, σε χιλιοστόλιτρα (5 ml ή 10 ml)

V_2 είναι ο συνολικός όγκος του διαλύματος ιωδικού καλίου, σε χιλιοστόλιτρα (250 ml ή 500 ml)

V_3 είναι ο όγκος του διαλύματος θειοθειικού νατρίου, σε χιλιοστόλιτρα

w_{KIO_3} είναι η καθαρότητα του ιωδικού καλίου, σε g/100 g.

M_{KIO_3} είναι η μοριακή μάζα του ιωδικού καλίου, (214 g/mol)

T είναι η ακριβής μοριακότητα του διαλύματος θειοθειικού νατρίου (mol/l).

- 5.5. Διάλυμα αμύλου, 10 g/l υδατική διασπορά, πρόσφατα παρασκευασμένο από φυσικό διαλυτό άμυλο. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ισοδύναμα αντιδραστήρια.

6. Δείγμα

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

7. Διαδικασία

Η δοκιμή πρέπει να διεξάγεται σε διάχυτο φως ημέρας ή σε τεχνητό φωτισμό. Ζυγίζεται σε γυάλινο κουτάλι (4.1) ή, αν αυτό δεν είναι δυνατόν, σε φιάλη (4.2) με ακρίβεια 0,001 g, μάζα του δείγματος σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα, ανάλογα με τον αναμενόμενο αριθμό υπεροξειδίων:

Αναμενόμενος αριθμός υπεροξειδίων (meq)	Βάρος του δείγματος δοκιμής (g)
0 έως 12	5,0 έως 2,0
12 έως 20	2,0 έως 1,2
20 έως 30	1,2 έως 0,8
30 έως 50	0,8 έως 0,5
50 έως 90	0,5 έως 0,3

Αποποματίζεται μία φιάλη (4.2) και εισάγεται το γυάλινο κουτάλι που περιέχει την ποσότητα του δείγματος. Προστίθενται 10 ml χλωροφορμίου (5.1). Διαλύεται το δείγμα γρήγορα με ανάδευση. Προστίθενται 15 ml οξικού οξέος (5.2), κατόπιν 1 ml διαλύματος ιωδιούχου καλίου (5.3). Πωματίζεται γρήγορα, το σύνολο αναδεύεται επί ένα λεπτό, και αφήνεται για πέντε λεπτά ακριβώς μακριά από το φως σε θερμοκρασία από 15 έως 25 °C.

▼ M30

Προστίθενται περίπου 75 ml απεσταγμένου νερού. Το ιώδιο που ελευθερώνεται τιτλοδοτείται με το διάλυμα θειοθειικού νατρίου (5.4) με ζωηρή ανάδευση, χρησιμοποιώντας διάλυμα αμόλου ως δείκτη (5.5).

Εκτελούνται δύο μετρήσεις ανά δείγμα.

Διενεργείται συγχρόνως τυφλή δοκιμή. Εάν το αποτέλεσμα της τυφλής δοκιμής ξεπερνά τα 0,05 ml διαλύματος 0,01 N θειοθειικού νατρίου (5.4), αντικαθίστανται τα αντιδραστήρια.

8. Έκφραση των αποτελεσμάτων

Ο αριθμός υπεροξειδίων (PV), εκφραζόμενος σε χιλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά kg, δίνεται από τον τύπο:

$$PV = \frac{V \times T \times 1\,000}{m}$$

όπου:

V = ο αριθμός των ml του τυποποιημένου διαλύματος θειοθειικού νατρίου (5.4) που χρησιμοποιείται για τη δοκιμή, διορθωμένος για να ληφθεί υπόψη η τυφλή δοκιμή.

T = η ακριβής μοριακότητα του διαλύματος θειοθειικού νατρίου (5.4) σε mol/l.

m = το βάρος της παρτίδας δοκιμής, σε g.

Ως αποτέλεσμα λαμβάνεται ο αριθμητικός μέσος όρος των δύο προσδιορισμών.

Αναφέρεται το αποτέλεσμα του προσδιορισμού με ένα δεκαδικό ψηφίο.

▼ **M21***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV***ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΚΗΡΟΥΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗΛΗΣ****1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ**

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

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

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

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

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

▼ **M21**

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

5. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

5.1. **Ετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης**

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

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

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

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

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

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

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

▼ **M21**

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

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

5.2.2. *Επιλογή των συνθηκών εργασίας*

Κατά κανόνα, πρέπει να τηρούνται οι ακόλουθες συνθήκες εργασίας:

— θερμοκρασία της στήλης:

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

— θερμοκρασία του ανιχνευτή: 350 °C,

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

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

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

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

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

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

5.3. **Εκτέλεση της ανάλυσης**

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

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

▼ **M21**

Η βασική γραμμή πρέπει πάντοτε να ανταποκρίνεται στους απαιτούμενους όρους.

5.4. **Ταυτοποίηση των κορυφών**

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

Το κατωτέρω σχήμα απεικονίζει χρωματογράφημα των κηρών παρθένου ελαιολάδου.

5.5. **Ποσοτικός προσδιορισμός**

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

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

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

όπου:

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

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

m_s = η προστιθέμενη μάζα εσωτερικού προτύπου, σε χιλιοστόγραμμα,

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

6. **ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

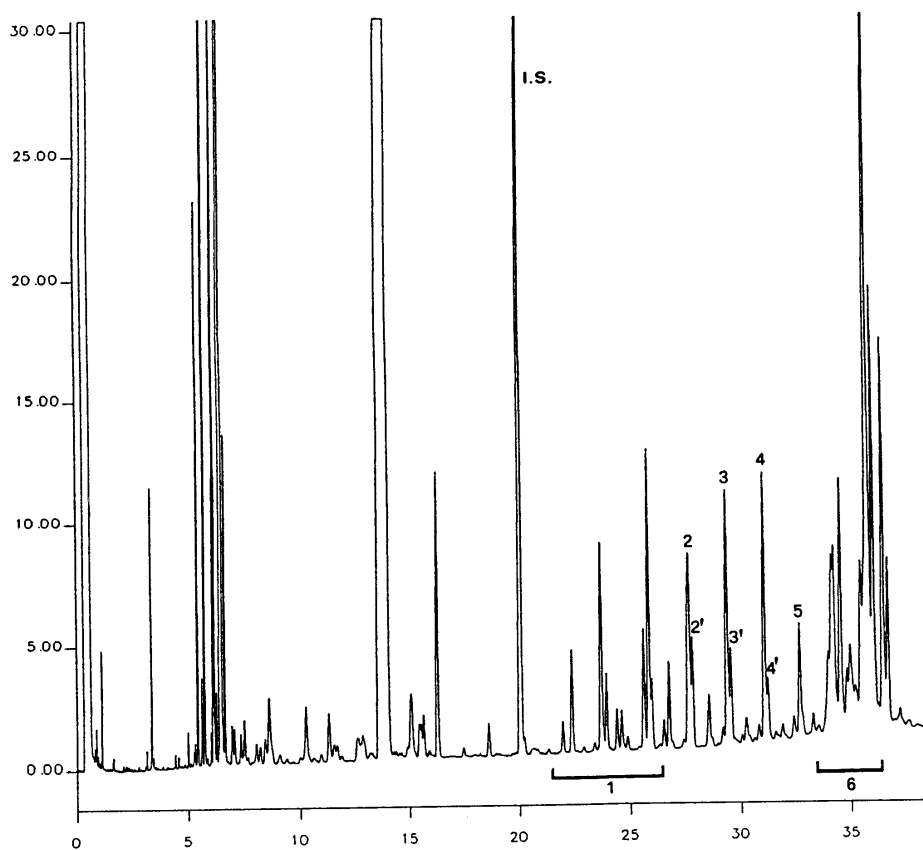
Αναφέρεται το άθροισμα των τιμών περιεκτικότητας σε κηρούς C₄₀ έως C₄₆, σε mg/kg λιπαρής ουσίας (ppm).

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

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

▼ M21

Σχήμα
Χρωματογράφημα κηρών παρθένου ελαιολάδου ⁽¹⁾



Υπόμνημα:

- I.S. = λαυρικός αραχιδεστέρας
 1 = Διτερπενικοί εστέρες
 2 + 2' = Εστέρες C₄₀
 3 + 3' = Εστέρες C₄₂
 4 + 4' = Εστέρες C₄₄
 5 = Εστέρες C₄₆
 6 = Τριτερπενικοί εστέρες στερολών και αλκοόλης.

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

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

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

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

▼ M32

▼ M26

▼ **M21***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII***ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΑΤΟΣΤΙΑΙΑΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ 2-MONO-ΠΑΛΜΙΤΙΝΗΣ**

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

 Η παρούσα μέθοδος έχει εφαρμογή στα φυτικά έλαια που είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C).
2. **ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**
 Μετά την παρασκευή του, το δείγμα ελαιολάδου υφίσταται την επίδραση παγκρεατικής λιπάσης: λόγω μερικής και εξειδικευμένης υδρόλυσης στις θέσεις 1 και 3 του μορίου του τριγλυκεριδίου, σχηματίζονται μονογλυκερίδια στη θέση 2. Μετά από σιλυλίωση (σιλιανοποίηση), προσδιορίζεται η εκατοστιαία αναλογία 2-μονοπαλμιτίνης στο κλάσμα των μονογλυκεριδίων με αέρια χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης.
3. **ΣΥΝΗΘΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ**
 - 3.1. Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) των 25 ml
 - 3.2. Ποτήρια ζέσεως των 100, 250 και 300 ml
 - 3.3. Γυάλινη χρωματογραφική στήλη, εσωτερικής διαμέτρου 21-23 mm και μήκους 400 mm, εφοδιασμένη με πλάκα από συντετηγμένο γυαλί και στρόφιγγα
 - 3.4. Ογκομετρικοί κύλινδροι των 10, 50, 100 και 200 ml
 - 3.5. Σφαιρικές φιάλες των 100 και 250 ml
 - 3.6. Περιστροφικός εξεταστήρας
 - 3.7. Σωλήνες φυγοκέντρου των 10 ml, με κωνικό πυθμένα και εσφυρισμένο πάμα
 - 3.8. Φυγόκεντρος για σωλήνες των 10 και 100 ml
 - 3.9. Θερμοστάτης ικανός να διατηρεί τη θερμοκρασία στους $40 \pm 0,5$ °C
 - 3.10. Βαθμολογημένα σιφόνια του 1 και των 2 ml
 - 3.11. Υποδερμική σύριγγα του 1 ml
 - 3.12. Μικροσύριγγα των 100 μl
 - 3.13. Διαχωριστική χοάνη των 1 000 ml
 - 3.14. Αεριοχρωματογράφος για τριχοειδείς στήλες, εφοδιασμένος με σύστημα έγχυσης εν ψυχρώ «on column» για απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη και με κλίβανο ικανό να διατηρεί την επιλεγόμενη θερμοκρασία με ακρίβεια 1 °C
 - 3.15. Σύστημα έγχυσης εν ψυχρώ «on column» για απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη
 - 3.16. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας και ηλεκτρόμετρο
 - 3.17. Καταγραφέας-ολοκληρωτής κατάλληλος για το ηλεκτρόμετρο, με χρόνο απόκρισης που δεν υπερβαίνει το 1 δευτερόλεπτο και με μεταβλητή ταχύτητα χαρτιού
 - 3.18. Τριχοειδής στήλη από γυαλί ή τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, μήκους 8 έως 12 μέτρων, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, επικαλυμμένη με μεθυλοπολυσιλοξάνιο ή φαινυλοπολυσιλοξάνιο 5 %, πάχους 0,10 έως 0,30 μm, με δυνατότητα χρήσης στους 370 °C

▼ M21

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

4. **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

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

▼ M32

4.2. n-εξάνιο (χρωματογραφικής καθαρότητας). Το εξάνιο μπορεί να αντικατασταθεί από ισοοκτάνιο (2,2,4-τριμεθυλοπεντάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας), υπό τον όρο ότι επιτυγχάνονται συγκρίσιμες τιμές πιστότητας.

▼ M21

4.3. Ισοπροπανόλη

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

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

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

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

4.8. Χλωριούχο ασβέστιο, υδατικό διάλυμα 22 %

4.9. Διαθυλαιθέρας για χρωματογραφία

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

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

4.12. Φαινολοφθαλεΐνη, διάλυμα 1 % σε αιθανόλη

4.13. Φέρον αέριο: υδρογόνο ή ήλιο για αέρια χρωματογραφία

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

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

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

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

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

▼ **M21**

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

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

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

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

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

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

- 5.1.3. *Ετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης*

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

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

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

- 5.1.4. *Χρωματογραφία στήλης*

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

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

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

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

Ζυγίζεται η σφαιρική φιάλη και υπολογίζεται το εκχύλισμα που συλλέχθηκε.

▼ **M21**

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

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

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

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

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

5.2. Υδρόλυση με παγκρεατική λιπάση

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

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

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

5.3. Παρασκευή των σιλυλοπαραγώγων και προετοιμασία της αέριας χρωματογραφίας

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

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

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

5.4. Αέρια χρωματογραφία

Οι συνθήκες εργασίας είναι οι ακόλουθες:

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

— θερμοκρασία του ανιχνευτή: 350 °C,

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

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

▼ **M21**

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

5.4.1. *Ταυτοποίηση των κορυφών*

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

5.4.2. *Ποσοτικός προσδιορισμός*

Το εμβαδόν κάθε κορυφής υπολογίζεται με ηλεκτρονικό ολοκληρωτή.

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

όπου:

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

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

Το αποτέλεσμα πρέπει να εκφράζεται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

7. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

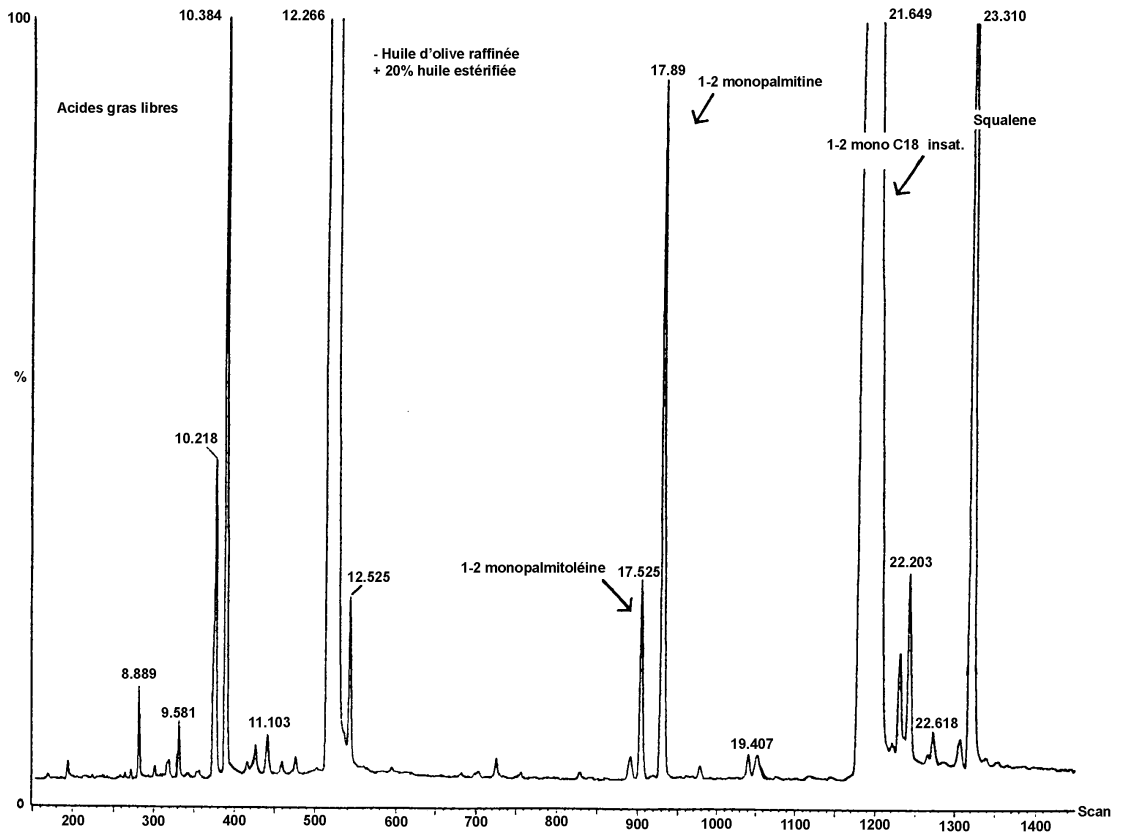
Στην έκθεση της ανάλυσης θα πρέπει να αναφέρονται τα εξής:

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

▼ M21

Σχήμα 1

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



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

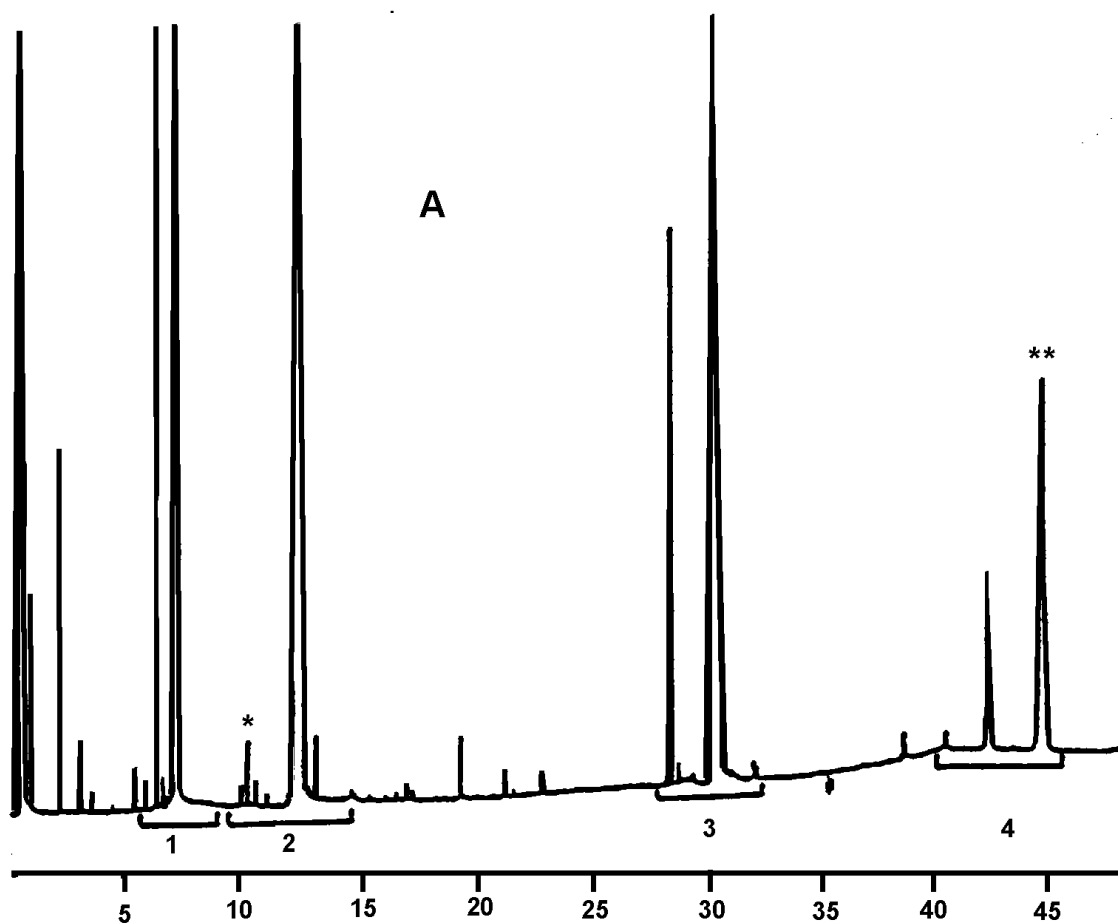
▼ M21

Σχήμα 2

Χρωματογράφημα:

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

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



Υπόμνημα:

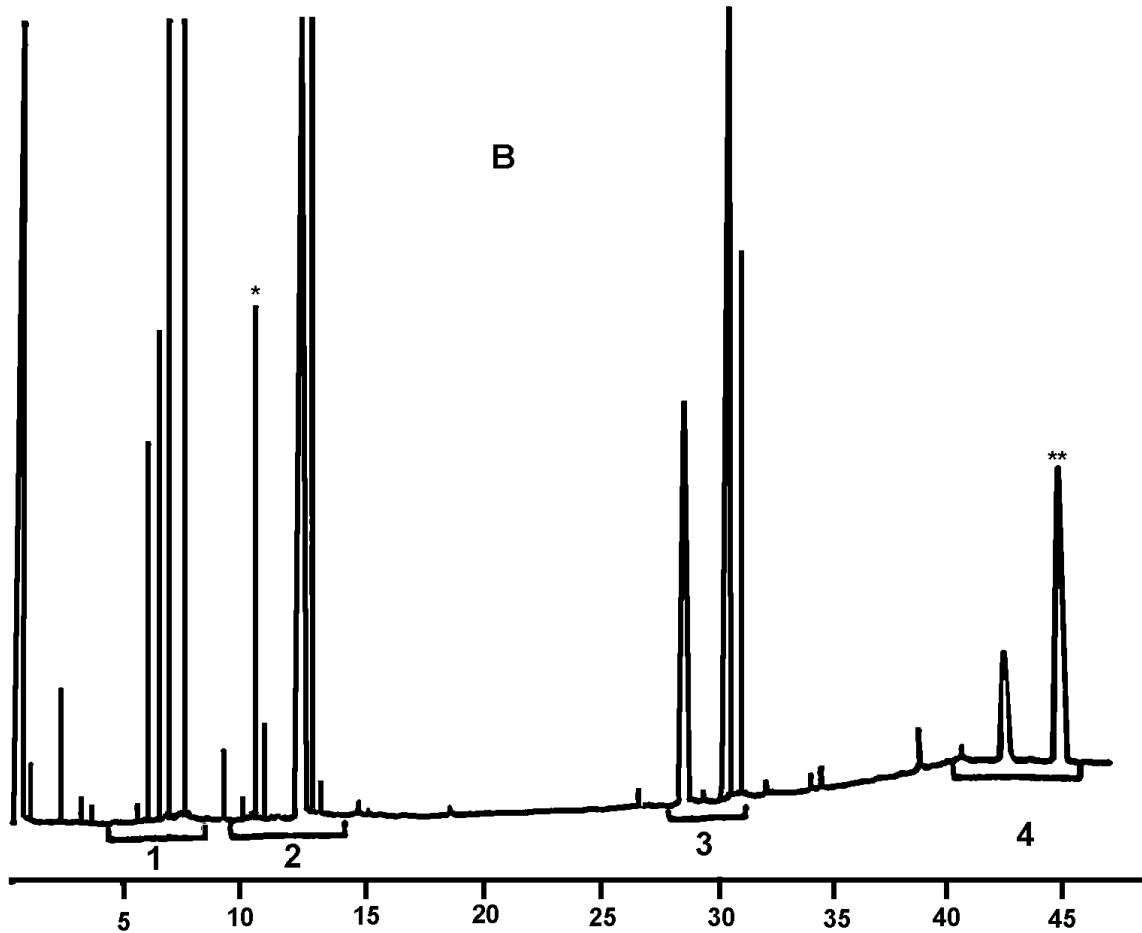
- 1 = Ελεύθερα λιπαρά οξέα
- 2 = Μονογλυκερίδια
- 3 = Διγλυκερίδια
- 4 = Τριγλυκερίδια
- * = 2-μονοπαλμιτίνη
- ** = Τριγλυκερίδιο C₅₄

▼ M21

Χρωματογράφημα:

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

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



Υπόμνημα:

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

▼ **M21**

8. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

Σημείωση 1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ

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

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

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

Σημείωση 2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ

Παρασκευάζεται γαλάκτωμα ελαιολάδου ως εξής:

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

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

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

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

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

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

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

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

όπου:

A = η δραστηριότητα σε μονάδες λιπάσης/mg,

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

N = η κανονικότητα του διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου,

m = η μάζα της ελεγχόμενης λιπάσης, σε mg.

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

▼ **M20**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IX

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με τη φασματοφωτομετρική εξέταση υπεριώδους είναι δυνατόν να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα μιας λιπαρής ύλης, την κατάσταση διατήρησής της και τις μεταβολές που προκλήθηκαν με τεχνολογικές διεργασίες. Η απορρόφηση στα μήκη κύματος που καθορίζονται στη μέθοδο οφείλεται στην παρουσία συζυγιακών διενίων και τριενίων που προέρχονται από διαδικασίες οξειδωσης και/ή πρακτικές εξευγενισμού. Η εν λόγω απορρόφηση εκφράζεται ως ειδική απόσβεση $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (η απόσβεση διαλύματος 1 % της λιπαρής ύλης στον καθοριζόμενο διαλύτη, με κυψελίδα των 10 mm), η οποία δηλώνεται κατά σύμβαση με το σύμβολο K (αναφέρεται επίσης ως «συντελεστής απόσβεσης»).

1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Στο παρόν παράρτημα περιγράφεται η διαδικασία φασματοφωτομετρικής εξέτασης του ελαιολάδου στο υπεριώδες τμήμα του φάσματος.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ένα δείγμα διαλύεται στον απαιτούμενο διαλύτη και, στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση του διαλύματος στα καθορισμένα μήκη κύματος έναντι του καθαρού διαλύτη.

Υπολογίζονται οι ειδικές αποσβέσεις σε μήκη κύματος 232 nm και 268 nm σε ισοοκτάνιο ή 232 nm και 270 nm σε κυκλοεξάνιο, για συγκέντρωση 1 % w/v και με κυψελίδα των 10 mm.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- 3.1. Φασματοφωτόμετρο κατάλληλο για μετρήσεις σε μήκη κύματος υπεριώδους (220 nm έως 360 nm), με δυνατότητα ένδειξης ανά νανομετρική μονάδα. Συνιστάται ο τακτικός έλεγχος για την ακρίβεια και την αναπαραγωγιμότητα των κλιμάκων μήκους κύματος και απορρόφησης, καθώς και για παράσιτο φως.

- 3.1.1. *Κλίμακα μήκους κύματος*: Η κλίμακα αυτή είναι δυνατόν να ελεγχθεί με τη χρήση υλικού αναφοράς, το οποίο συνιστάται σε γυάλινο οπτικό φίλτρο που περιέχει οξειδίο του ολμίου ή διάλυμα οξειδίου του ολμίου (σφραγισμένο ή όχι) που έχει διακριτές φασματικές ζώνες απορρόφησης. Τα υλικά αναφοράς είναι σχεδιασμένα για τον έλεγχο και τη βαθμονόμηση των κλιμάκων μήκους κύματος των φασματοφωτομέτρων ορατού και υπεριώδους με μέγιστο ονομαστικό εύρος φασματικής ζώνης 5 nm. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται έναντι αέρα ως τυφλού στην περιοχή μηκών κύματος 640 έως 240 nm, σύμφωνα με τις οδηγίες που επισυνάπτονται στα υλικά αναφοράς. Διορθώνεται η γραμμική βάσης με κενή διαδρομή της δέσμης σε κάθε μεταβολή του πλάτους της σχισμής. Τα μήκη κύματος του προτύπου παρατίθενται στο πιστοποιητικό του υλικού αναφοράς.

- 3.1.2. *Κλίμακα απορρόφησης*: Η κλίμακα αυτή είναι δυνατόν να ελεγχθεί με τη χρήση υλικών αναφοράς που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, τα οποία συνιστάται σε όξινα διαλύματα διχρωμικού καλίου, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και σε πιστοποιημένες τιμές απορρόφησης στο λ_{max} (σε τέσσερα διαλύματα διχρωμικού καλίου σε υπερχλωρικό οξύ, τοποθετημένα σε τέσσερις ερμητικά σφραγισμένες κυψελίδες υπεριώδους από χαλαζία, για τη μέτρηση της γραμμικότητας και της φωτομετρικής ακρίβειας στο υπεριώδες τμήμα του φάσματος). Τα διαλύματα διχρωμικού καλίου μετρώνται έναντι τυφλού του χρησιμοποιούμενου οξέος, μετά από διόρθωση της γραμμής βάσεως, σύμφωνα με τις οδηγίες που επισυνάπτονται στο υλικό αναφοράς. Οι τιμές απορρόφησης παρατίθενται στο πιστοποιητικό του υλικού αναφοράς.

Μια άλλη δυνατότητα για να ελεγχθεί η απόκριση του φωτοκυττάρου και του φωτοπολλαπλασιαστή προσφέρει η ακόλουθη διαδικασία: ζυγίζονται 0,2000 g καθαρού χρωμικού καλίου για φασματοφωτομετρία, διαλύονται σε διάλυμα 0,05 N υδροξειδίου του καλίου σε ογκομετρική φιάλη των 1 000 ml και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή. Λαμβάνονται ακριβώς 25 ml από το διάλυμα, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml και το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τη χαραγή, με τη χρήση ίδιου διαλύματος υδροξειδίου του καλίου.

▼ **M28**

Μετράται η απόσβεση του διαλύματος που λαμβάνεται κατ' αυτόν τον τρόπο στα 275 nm, με τη χρήση του διαλύματος υδροξειδίου του καλίου ως αναφοράς. Η απόσβεση που μετρήθηκε με τη χρήση κυψελίδας 1 cm θα πρέπει να είναι $0,200 \pm 0,005$.

- 3.2. Ορθογώνιες κυψελίδες από χαλαζία με καλύμματα, κατάλληλες για μετρήσεις σε μήκη κύματος στην υπεριώδη ακτινοβολία (220 έως 360 nm) οπτικής path-length 10 mm. Όταν πληρούνται με νερό ή άλλον κατάλληλο διαλύτη, οι κυψελίδες δεν πρέπει να εμφανίζουν διαφορά μεταξύ τους μεγαλύτερη από 0,01 μονάδες απόσβεσης.
- 3.3. Ογκομετρικές φιάλες μιας χαραγής χωρητικότητας 25 ml, κλάσης A.
- 3.4. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ενδείξεων 0,0001 g.

4. **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά, χρησιμοποιούνται μόνον αντιδραστήρια αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας και νερό αποσταγμένο ή απιονισμένο ή ισοδύναμης καθαρότητας.

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

5. **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

- 5.1. Το δείγμα πρέπει να είναι απόλυτα ομοιογενές και απαλλαγμένο από αιωρούμενες προσμείξεις. Σε αντίθετη περίπτωση, πρέπει να διηθείται με χάρτινο ηθμό σε θερμοκρασία 30 °C περίπου.
- 5.2. Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml ζυγίζονται επακριβώς (με ακρίβεια 1 mg) περίπου 0,25 g του προετοιμασμένου με τον τρόπο αυτό δείγματος, συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με τον καθορισμένο διαλύτη και το μείγμα ομοιογενοποιείται. Το διάλυμα που προκύπτει πρέπει να είναι τελείως διαυγές. Εάν παρατηρηθεί γαλακτώδης ιριδισμός ή θολερότητα, το διάλυμα διηθείται γρήγορα με χάρτινο ηθμό.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Γενικά, μάζα 0,25 έως 0,30 g αρκεί για μετρήσεις απορρόφησης των παρθένων και των εξαιρετικά παρθένων ελαιολάδων στα 268 nm και 270 nm. Για μετρήσεις σε μήκος κύματος 232 nm, απαιτούνται συνήθως 0,05 g δείγματος, και για τον λόγο αυτό παρασκευάζονται κατά κανόνα δύο διαφορετικά διαλύματα. Για μετρήσεις απορρόφησης των πυρηνελαίων, των εξευγενισμένων ελαιολάδων και των νοθευμένων ελαιολάδων, απαιτείται συνήθως μικρότερη ποσότητα δείγματος, π.χ. 0,1 g, λόγω της υψηλότερης απορρόφησής τους.

- 5.3. Εφόσον χρειάζεται, διορθώνεται η γραμμική βάσεως (220-290 nm) με διαλύτη και στις δύο κυψελίδες από χαλαζία (δείγμα και αναφοράς), κατόπιν πληρούνται με το διάλυμα δοκιμής μια κυψελίδα από χαλαζία και μετρώνται οι αποσβέσεις σε 232, 268 και 270 nm έναντι του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε.

Οι καταγραφόμενες τιμές απόσβεσης πρέπει να βρίσκονται εντός του εύρους από 0,1 έως 0,8 ή εντός του εύρους γραμμικότητας του φασματοφωτομέτρου που θα πρέπει να επαληθευθεί. Σε αντίθετη περίπτωση, πρέπει να επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις με τη χρήση πυκνότερου ή αραιότερου διαλύματος, αναλόγως.

- 5.4. Μετά τη μέτρηση της απορρόφησης σε 268 ή 270 nm και μετράται η απορρόφηση σε λ_{max} , $\lambda_{max} + 4$ and $\lambda_{max} - 4$. Οι εν λόγω τιμές απορρόφησης χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί η μεταβολή της ειδικής απόσβεσης (ΔK).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το λ_{max} θεωρείται ότι είναι 268 nm για το ισοοκτάνιο που χρησιμοποιείται ως διαλύτης και 270 nm για το κυκλοεξάνιο.

▼ M28

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s}$$

όπου:

$K\lambda$ = ειδική απόσβεση σε μήκος κύματος λ ,

$E\lambda$ = μετρούμενη απόσβεση σε μήκος κύματος λ ,

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

S = μήκος διαδρομής της κυψελίδας από χαλαζία, σε cm, εκφραζόμενο με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων.

- 6.2. Μεταβλητότητα της ειδικής απόσβεσης (ΔK)

Η μεταβλητότητα της απόλυτης τιμής απόσβεσης (ΔK) υπολογίζεται με τον τύπο:

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

όπου K_m είναι η ειδική απόσβεση σε μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση στα 270 nm και 268 nm, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο διαλυτικό μέσο.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων.

▼ **M28****ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Χ****ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ
ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ****1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Το παρόν παράρτημα παρέχει καθοδήγηση για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό των ελεύθερων και των δεσμευμένων λιπαρών οξέων σε φυτικά λίπη και έλαια μετά τη μετατροπή τους σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME).

Τα δεσμευμένα λιπαρά οξέα στον τριακυλογλυκερολών (TAG) και, ανάλογα με τη μέθοδο εστεροποίησης, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME), που προσδιορίζονται με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης.

Η μέθοδος που περιγράφεται στο παρόν παράρτημα επιτρέπει τον προσδιορισμό των FAME από C12 έως C24, περιλαμβανομένων των κορεσμένων, cis- και trans-μονοακόρεστων και cis- και trans-πολυακόρεστων μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων.

2. ΑΡΧΗ

Η αεριοχρωματογραφία (GC) χρησιμοποιείται για την ποσοτική ανάλυση των FAME (μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων). Οι FAME παρασκευάζονται σύμφωνα με το μέρος Α. Εν συνεχεία, εγγέονται στο σύστημα έγχυσης και εξατμίζονται εντός αυτού. Ο διαχωρισμός των FAME διεξάγεται σε αναλυτικές στήλες συγκεκριμένης πολικότητας και μήκους. Για την ανίχνευση των FAME χρησιμοποιείται ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID). Οι συνθήκες ανάλυσης παρατίθενται στο μέρος Β.

Ως φέρον αέριο (κινητή φάση) στην αεριοχρωματογραφία των FAME με FID μπορεί να χρησιμοποιείται υδρογόνο ή ήλιο. Το υδρογόνο επιταχύνει τον διαχωρισμό και παρέχει πιο ευδιάκριτες κορυφές. Η στατική φάση είναι μικροσκοπική στιβάδα λεπτού υγρού υμενίου επί αδρανούς στερεάς επιφάνειας που έχει κατασκευαστεί από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου.

Κατά τη διέλευσή τους μέσω της τριχοειδούς στήλης, οι υπό ανάλυση εξατμισθείσες ενώσεις αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση που επιστρώει την εσωτερική επιφάνεια της στήλης. Λόγω της διαφορετικής αλληλεπίδρασης των διαφόρων ενώσεων, εκλύονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Πρόκειται για τον λεγόμενο «χρόνο κατακράτησης» της ένωσης για ένα δεδομένο σύνολο παραμέτρων της ανάλυσης. Η σύγκριση των χρόνων κατακράτησης χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των διαφόρων ενώσεων.

ΜΕΡΟΣ Α**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ
ΚΑΙ ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΟΥ****1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Το μέρος αυτό καθορίζει την παρασκευή των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων. Περιλαμβάνει διαδικασίες για την παρασκευή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων ελαιολάδου και πυρηνελαίου.

2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η παρασκευή των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων ελαιολάδου και πυρηνελαίων εκτελείται με μετεστεροποίηση σε μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου σε θερμοκρασία δωματίου. Η αναγκαιότητα του καθαρισμού του δείγματος πριν από τη μετεστεροποίηση εξαρτάται από την περιεκτικότητα του δείγματος σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και την προς προσδιορισμό αναλυτική παράμετρο, μπορεί δε να επιλεγεί σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

▼ **M28**

Κατηγορία ελαίου	Μέθοδος
Παρθένο ελαιόλαδο με οξύτητα ≤ 2,0 %	1. Λιπαρά οξέα
Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	2. Trans-λιπαρά οξέα
Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα	3. ΔECN 42 (μετά τον καθαρισμό με πυριτική πηκτή για SPE)
Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο	
Πυρηνέλαιο	
Παρθένο ελαιόλαδο με οξύτητα > 2,0 % Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	1. Λιπαρά οξέα (μετά τον καθαρισμό με πυριτική πηκτή για SPE) 2. Trans-λιπαρά οξέα (μετά τον καθαρισμό με πυριτική πηκτή για SPE) 3. ΔECN 42 (μετά τον καθαρισμό με πυριτική πηκτή για SPE)

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1. Μετεστεροποίηση σε μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου σε θερμοκρασία δωματίου

3.1.1. Βασική αρχή

Οι μεθυλεστέρες σχηματίζονται με μετεστεροποίηση σε μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου ως ενδιάμεση φάση πριν από τη σαπωνοποίηση.

3.1.2. Αντιδραστήρια

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

3.1.2.2. Εξάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας.

3.1.2.3. Επτάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας.

3.1.2.4. Διαιθυλικός αιθέρας (οξείδιο διαιθυλίου), σταθεροποιημένος για ανάλυση.

3.1.2.5. Ακετόνη, χρωματογραφικής καθαρότητας.

3.1.2.6. Διαλύτης έκλυσης για τον καθαρισμό του ελαίου με χρωματογραφία στήλης/εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), μείγμα εξανίου-διαιθυλαιθέρα 87/13 (v/v).

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

3.1.2.8. Φύσιγγες πυριτικής πηκτής του 1 g (6 ml), για εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).

3.1.3. Εξοπλισμός

3.1.3.1. Δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό πόμα (χωρητικότητας 5 ml) εφοδιασμένο με παρέμβυσμα από PTFE.

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

▼ **M28**3.1.4. *Καθαρισμός δειγμάτων ελαίου*

Εφόσον είναι αναγκαίο, τα δείγματα καθαρίζονται με διοξέτευση του ελαίου από φύσιγγα εκχύλισης στερεάς φάσης από διοξειδίο του πυριτίου. Φύσιγγα διοξειδίου του πυριτίου (3.1.2.8) τοποθετείται σε συσκευή εκλούσεως υπό κενό και πλένεται με 6 ml εξανίου (3.1.2.2). Η πλύση πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση. Στη συνέχεια, εισάγεται στη στήλη διάλυμα ελαίου (περίπου 0,12 g) σε 0,5 ml εξανίου (3.1.2.2) για εισαγωγή του διαλύματος στο διοξειδίο του πυριτίου και στη συνέχεια γίνεται έκλουση με 10 ml εξανίου/διαιθυλαιθέρα (87:13 v/v) (3.1.2.6). Το σύνολο των εκλουσμάτων ομοιογενοποιείται και χωρίζεται σε δύο ίσα μέρη. Το ένα εκ των δύο μερών εξατμίζεται μέχρι ξηράνσεως σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό ελαττωμένη πίεση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 1 ml επτανίου. Το λαμβανόμενο διάλυμα είναι έτοιμο για την ανάλυση των λιπαρών οξέων με αεριοχρωματογράφο. Το δεύτερο μέρος εξατμίζεται και το υπόλειμμα διαλύεται σε 1 ml ακετόνης για ανάλυση των τριγλυκεριδίων, με HPLC εφόσον χρειάζεται.

3.1.5. *Διαδικασία*

Σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα των 5 ml (3.1.3.1), ζυγίζονται περίπου 0,1 g δείγματος ελαίου. Προστίθενται 2 ml (3.1.2.2) επτανίου και αναδεύονται. Προστίθενται 0,2 ml μεθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (3.1.2.7), 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 καταστεί διαυγές. Η άνω στιβάδα, η οποία και περιέχει τους μεθυλεστέρες, μεταγγίζεται. Το διάλυμα επτανίου είναι έτοιμο για έγχυση στον αεριοχρωματογράφο. Είναι σκόπιμο να διατηρείται το διάλυμα στο ψυγείο μέχρι την αεριοχρωματογραφική ανάλυση. Δεν συνιστάται η αποθήκευση του διαλύματος για περισσότερες από 12 ώρες.

ΜΕΡΟΣ Β

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Το παρόν μέρος παρέχει γενικές οδηγίες για την εφαρμογή της αεριοχρωματογραφίας τριχοειδούς στήλης για τον προσδιορισμό της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης μείγματος μεθυλεστέρων, οι οποίοι λαμβάνονται από λιπαρά οξέα με τη μέθοδο που καθορίζεται στο μέρος Α.

Το παρόν μέρος δεν έχει εφαρμογή στα πολυμερισμένα λιπαρά οξέα.

2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

2.1. **Φέρον αέριο**

Αδρανές αέριο (ήλιο ή υδρογόνο) που έχει πλήρως ξηρανθεί και περιέχει λιγότερο από 10 mg/kg οξυγόνου.

Σημείωση 1: Το υδρογόνο μπορεί να διπλασιάσει την ταχύτητα της ανάλυσης, αλλά είναι επικίνδυνο. Υπάρχουν διαθέσιμα συστήματα ασφαλείας.

2.2. **Βοηθητικά αέρια**

2.2.1. Υδρογόνο (καθαρότητα $\geq 99,9$ %) απαλλαγμένο από οργανικές προσμείξεις.

2.2.2. Αέρας ή οξυγόνο απαλλαγμένα από οργανικές προσμείξεις.

2.2.3. Άζωτο (καθαρότητα > 99 %).

2.3. **Πρότυπο αναφοράς**

Μείγμα μεθυλεστέρων καθαρών λιπαρών οξέων ή μεθυλεστέρες λιπών γνωστής σύστασης, κατά προτίμηση ανάλογης με τη σύσταση της προς ανάλυση λιπαρής ύλης. Τα cis και trans ισομερή δεκαοκτενοϊκών, δεκαοκταδιενικών και δεκαοκτατριενικών μεθυλεστέρων είναι χρήσιμα για τον προσδιορισμό των trans ισομερών των ακόρεστων οξέων.

Θα πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να παρεμποδιστεί η οξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

▼ **M28****3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ**

Οι παρεχόμενες υποδείξεις αφορούν τον συνήθη εργαστηριακό εξοπλισμό αέριας χρωματογραφίας, με χρήση τριχοειδών στηλών και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.

3.1. Αεριοχρωματογράφος

Ο αεριοχρωματογράφος αποτελείται από τα ακόλουθα στοιχεία:

3.1.1. Σύστημα έγχυσης

Χρησιμοποιείται σύστημα έγχυσης με τριχοειδείς στήλες, οπότε το σύστημα έγχυσης θα πρέπει να είναι ειδικά σχεδιασμένο για χρήση με στήλες του είδους αυτού. Μπορεί να είναι σύστημα με διαμοιραστή ροής (split) ή σύστημα έγχυσης στη στήλη (on-column) χωρίς διαμοιραστή ροής (splitless).

3.1.2. Κλίβανος

Ο κλίβανος πρέπει να θερμαίνει την τριχοειδή στήλη σε θερμοκρασία τουλάχιστον 260 °C και να διατηρεί την επιθυμητή θερμοκρασία με ακρίβεια $\pm 0,1$ °C. Η δεύτερη απαίτηση έχει ιδιαίτερη σημασία όταν χρησιμοποιείται στήλη από συντετηγμένο διοξείδιο του 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. Τριχοειδής στήλη

3.1.3.1. Στήλη κατασκευασμένη από υλικό αδρανές σε σχέση με τις προς ανάλυση ουσίες (συνήθως γυαλί ή συντετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου). Η εσωτερική διάμετρος κυμαίνεται μεταξύ 0,20 mm και 0,32 mm. Η εσωτερική επιφάνεια υποβάλλεται σε κατάλληλη κατεργασία (επιφανειακή προετοιμασία, αδρανοποίηση), πριν επιστρωθεί με τη στατική φάση. Μήκος 60 m αρκεί για τα λιπαρά οξέα και τα cis και trans ισομερή των λιπαρών οξέων.

3.1.3.2. Στατική φάση, κατάλληλες είναι οι στήλες με σταυροδεσμούς πολικού πολυσιλοξάνιου (κυανοπροπολυοσιλικόνη).

Σημείωση 2: 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 έως 0,2 μm .

3.1.3.3. Συναρμολόγηση και προετοιμασία («κοντισιονάρισμα») της στήλης.

Κατά τη συναρμολόγηση των τριχοειδών στηλών τηρούνται οι συνθήκες 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 ωφέλιμων χώρων). Η στήλη τοποθετείται κάτω από ρεύμα φέροντος αερίου [παραδείγματος χάρη 0,3 bar (30 kPa), προκειμένου για στήλη μήκους 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 στη θερμοκρασία αυτή επί μία ώρα, μέχρι να σταθεροποιηθεί η γραμμή βάσεως. Έπειτα επαναφέρεται στους 180 °C για λειτουργία σε ισόθερμες συνθήκες.

Σημείωση 3: Στο εμπόριο κυκλοφορούν κατάλληλα προετοιμασμένες στήλες.

3.1.4. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας και μετατροπέας-ενισχυτής

3.2. Σύριγγα

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

3.3. Σύστημα απόκτησης δεδομένων

Σύστημα απόκτησης δεδομένων που συνδέεται επιγραμμικά με τους ανιχνευτές και χρησιμοποιείται με λογισμικό κατάλληλο για ολοκλήρωση και κανονικοποίηση των κορυφών.

▼ **M28****4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

Οι εργασίες που περιγράφονται στα σημεία 4.1 έως 4.3 αφορούν τη χρήση ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.

4.1. Συνθήκες δοκιμής**4.1.1. Επιλογή βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας για τριχοειδείς στήλες**

Λόγω των χαρακτηριστικών αποδοτικότητας και δυνατότητας των τριχοειδών στηλών, ο διαχωρισμός των συστατικών και η διάρκεια της ανάλυσης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου στη στήλη. Θα χρειαστεί επομένως να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες λειτουργίας με προσαρμογή αυτής της παραμέτρου (ή απλώς με απώλεια πίεσης στην κορυφή της στήλης), ανάλογα με το εάν στόχος είναι η βελτίωση του διαχωρισμού ή η επιτάχυνση της ανάλυσης.

Οι ακόλουθες συνθήκες έχουν αποδειχθεί κατάλληλες για τον διαχωρισμό των FAME (C₄ έως C₂₆). Παραδείγματα χρωματογραφήματων παρουσιάζονται στο προσάρτημα Β:

θερμοκρασία του συστήματος έγχυσης:	250 °C
θερμοκρασία του ανιχνευτή:	250 °C
θερμοκρασία του κλιβάνου:	165 °C (8 min) έως 210 °C σε 2 °C/min
υδρογόνο ως φέρον αέριο:	πίεση στην κορυφή της στήλης: 179 kPa
συνολική ροή:	154,0 ml/min
αναλογία διαμοιρασμού:	1:100
όγκος έγχυσης:	1 μl

4.1.2. Προσδιορισμός της διακριτικής ικανότητας (βλ. προσάρτημα Α)

Υπολογίζεται η διακριτική ικανότητα, R, δύο γειτονικών κορυφών I και II, με χρήση του τύπου:

$$R = 2 \times \frac{(d_{r(II)} - d_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})}{t_{r(I)}/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})} \text{ (USP) (Φαρμακοποιία ΗΠΑ)}$$

ή

$$R = 1,18 \times \frac{(t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)})}{(EP, BP, JP, DAB) [JP \text{ (Ιαπωνική Φαρμακοποιία), EP (Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία), BP (Βρετανική Φαρμακοποιία)]}$$

όπου:

$d_{r(I)}$ είναι η απόσταση κατακράτησης της κορυφής I·

$d_{r(II)}$ είναι η απόσταση κατακράτησης της κορυφής II·

$t_{r(I)}$ είναι ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής I·

$t_{r(II)}$ είναι ο χρόνος κατακράτησης της κορυφής II·

$\omega_{(I)}$ είναι το πλάτος της βάσης της κορυφής I·

$\omega_{(II)}$ είναι το πλάτος της βάσης της κορυφής II·

$\omega_{0,5}$ είναι το πλάτος της κορυφής της συγκεκριμένης ένωσης στο μέσον του ύψους της κορυφής.

Εάν $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, η διακριτική ικανότητα R υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους τύπους:

$$R = (d_{r(II)} - d_{r(I)})/\omega = (d_{r(II)} - d_{r(I)})/4\sigma$$

όπου:

σ είναι η τυπική απόκλιση (βλέπε προσάρτημα Α, σχήμα 1).

▼ **M28**

Εάν η απόσταση dr μεταξύ των δύο κορυφών $d_{r(II)} - d_{r(I)}$ είναι ίση με 4σ , ο παράγων διακριτικής ικανότητας $R = 1$.

Εάν δύο κορυφές δεν διαχωρίζονται πλήρως, οι εφαπτόμενες στα σημεία καμπής των δύο κορυφών τέμνονται στο σημείο C. Για να διαχωριστούν πλήρως οι δύο κορυφές, η μεταξύ τους απόσταση πρέπει να είναι ίση με:

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma \text{ εξού } R = 1,5 \text{ (βλέπε προσάρτημα A, σχήμα 3).}$$

5. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

5.1. Ποιοτική ανάλυση

Οι κορυφές που αντιστοιχούν στους μεθυλεστέρες του δείγματος του χρωματογραφήματος στο προσάρτημα Β σχήμα 1 ταυτοποιούνται, αν είναι απαραίτητο με παρεμβολή ή με σύγκριση με εκείνες των μειγμάτων μεθυλεστέρων αναφοράς (όπως αναφέρεται στο σημείο 2.3).

5.2. Ποσοτική ανάλυση

5.2.1. Προσδιορισμός της σύστασης

Υπολογίζεται το κλάσμα της κατά μάζα περιεκτικότητας w_i των επιμέρους μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων, εκφραζόμενο ως κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία μεθυλεστέρων, ως εξής:

5.2.2. Μέθοδος 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 ακόλουθο τύπο:

$$w_i = (A_i/\Sigma A) \times 100$$

όπου:

A_i είναι το εμβαδόν κάτω από την κορυφή του επιμέρους μεθυλεστέρα λιπαρού οξέος i .

ΣA είναι το άθροισμα των εμβαδών που περιλαμβάνονται από όλες τις κορυφές όλων των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία.

Σημείωση 4: Για τα λίπη και τα έλαια, το κλάσμα της κατά μάζα περιεκτικότητας των μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων ισούται με το κλάσμα της κατά μάζα περιεκτικότητας των τριακυλογλυκερολών σε γραμμάρια ανά 100 g. Για τις περιπτώσεις στις οποίες η παραδοχή αυτή δεν επιτρέπεται, βλ. 5.2.2.2.

5.2.2.2. Χρήση συντελεστών διορθώσεως

Σε ορισμένες περιπτώσεις, για παράδειγμα παρουσία λιπαρών οξέων με λιγότερα από 8 άτομα άνθρακα ή οξέων με δευτερεύουσες ομάδες, τα εμβαδά διορθώνονται με ειδικούς συντελεστές διόρθωσης. Οι συντελεστές αυτοί καθορίζονται για κάθε επιμέρους όργανο. Προς τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται κατάλληλα υλικά αναφοράς με πιστοποιημένη σύσταση σε λιπαρά οξέα στο αντίστοιχο πεδίο τιμών.

Σημείωση 5: Οι εν λόγω συντελεστές διορθώσεως δεν είναι ταυτόσημοι με τους θεωρητικούς συντελεστές διορθώσεως του FID, οι οποίοι παρατίθενται στο προσάρτημα Α, δεδομένου ότι περιλαμβάνουν επίσης τις επιδόσεις του συστήματος έγχυσης κ.λπ. Ωστόσο, σε περίπτωση μεγαλύτερων διαφορών, πρέπει να ελέγχεται ολόκληρο το σύστημα ως προς τις επιδόσεις.

▼ **M28**

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

$$w_i = (m_i/\Sigma m) \times 100$$

όπου:

m_i είναι το εμβαδόν του FFAME i στο μείγμα αναφοράς·

Σm είναι η συνολική μάζα των διαφόρων συστατικών ως FAME του μείγματος αναφοράς.

Από το χρωματογράφημα του μείγματος αναφοράς υπολογίζεται το επί τοις εκατό ποσοστό ανά εμβαδόν για το FAME i ως εξής:

$$w_i = (A_i/\Sigma A) \times 100$$

όπου:

A_i είναι το εμβαδόν του FAME i στο μείγμα αναφοράς·

ΣA είναι το άθροισμα όλων των εμβαδών όλων των FAME του μείγματος αναφοράς.

Οπότε ο συντελεστής διορθώσεως F_c είναι

$$F_c = (m_i \times \Sigma A)/(A_i \times \Sigma m)$$

Για το δείγμα, η κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία κάθε FAME i είναι:

$$w_i = (F_i \times A_i)/\Sigma (F_i \times A_i)$$

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία.

Σημείωση 6: Η υπολογιζόμενη τιμή αντιστοιχεί στην κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία του επιμέρους λιπαρού οξέος υπολογιζόμενη ως τριακυλογλυκερόλες λιπαρού οξέος ανά 100 g λίπους.

5.2.2.3. Χρήση εσωτερικού προτύπου

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

$$w_i = (m_{IS} \times F_i \times A_i)/(m \times F_{IS} \times A_{IS})$$

όπου:

A_i είναι το εμβαδόν του FAME i ·

A_{IS} είναι το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου·

F_i είναι ο συντελεστής διορθώσεως του λιπαρού οξέος i , εκφραζόμενος ως FAME·

F_{IS} είναι ο συντελεστής διορθώσεως του εσωτερικού προτύπου·

m είναι η μάζα του δείγματος δοκιμής, σε χιλιοστόγραμμα·

m_{IS} είναι η μάζα του εσωτερικού προτύπου, σε χιλιοστόγραμμα.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία.

▼ M28**6. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΩΝ**

Στην έκθεση ανάλυσης περιγράφονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των μεθυλεστέρων και για την αεριοχρωματογραφική τους ανάλυση. Αναφέρονται επίσης όλες οι λεπτομέρειες της εκτέλεσης που δεν καθορίζεται στην παρούσα πρότυπη μέθοδο, ή θεωρείται προαιρετική, καθώς και οι λεπτομέρειες τυχόν συμβάντων που ενδέχεται να έχουν επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Η έκθεση ελέγχου περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία που είναι απαραίτητα για την πλήρη ταυτοποίηση του δείγματος.

7. ΑΚΡΙΒΕΙΑ**7.1. Αποτελέσματα διεργαστηριακής δοκιμής**

Λεπτομέρειες σχετικά με διεργαστηριακή δοκιμή για την ακρίβεια της μεθόδου παρατίθενται στο παράρτημα Γ του προτύπου IOC/T.20/Doc. αριθ. 33. Οι τιμές που προέκυψαν από αυτή τη διεργαστηριακή δοκιμή ενδέχεται να μην ισχύουν για πεδία τιμών συγκέντρωσης και υλικά διαφορετικά από τα αναφερόμενα.

7.2. Επαναληψιμότητα

Η διαφορά σε απόλυτες τιμές μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο ανεξάρτητων μεμονωμένων δοκιμών που εκτελέστηκαν με μικρή χρονική διαφορά με την ίδια μέθοδο σε πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό στο ίδιο εργαστήριο από τον ίδιο τεχνικό, ο οποίος χρησιμοποίησε τον ίδιο εξοπλισμό, δεν πρέπει να υπερβαίνει σε περισσότερες από το 5 % των περιπτώσεων την τιμή R που αναφέρεται στους πίνακες 1 έως 14 του παραρτήματος Γ του προτύπου IOC/T.20/Doc. αριθ. 33.

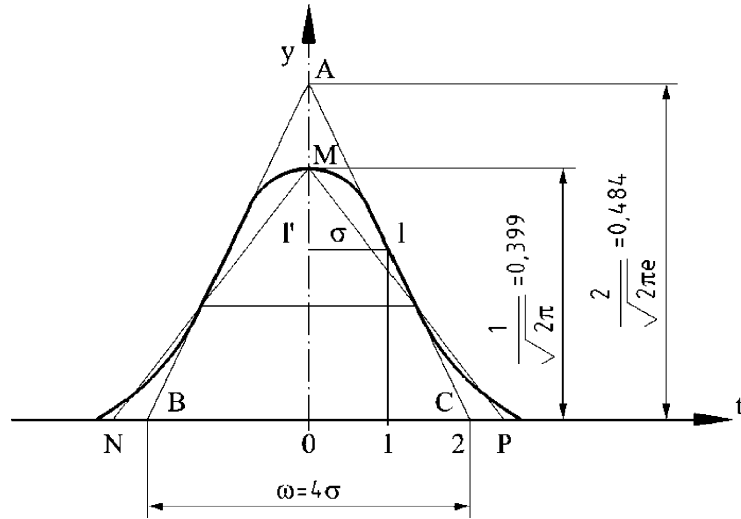
7.3. Αναπαραγωγιμότητα

Η διαφορά σε απόλυτες τιμές μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών που εκτελέστηκαν με την ίδια μέθοδο σε πανομοιότυπο ελεγχόμενο υλικό σε διαφορετικά εργαστήρια από διαφορετικούς τεχνικούς που χρησιμοποίησαν διαφορετικό εξοπλισμό, δεν πρέπει να υπερβαίνει σε περισσότερες από το 5 % των περιπτώσεων την τιμή R που αναφέρεται στους πίνακες 1 έως 14 του παραρτήματος Γ του προτύπου IOC/T.20/Doc. αριθ. 33.

▼ M28

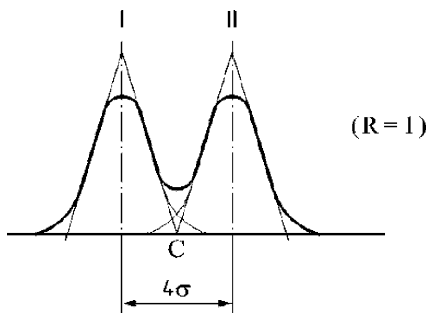
Προσάρτημα Α

Σχήμα 1

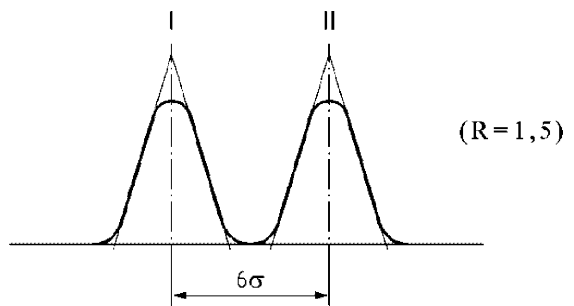


με $\omega_{0,5}$ πλάτος γραμμής στο ήμισυ του ύψους του τριγώνου (ABC) και b πλάτος του τριγώνου στο ήμισυ του ύψους (NPM).

Σχήμα 2



Σχήμα 3

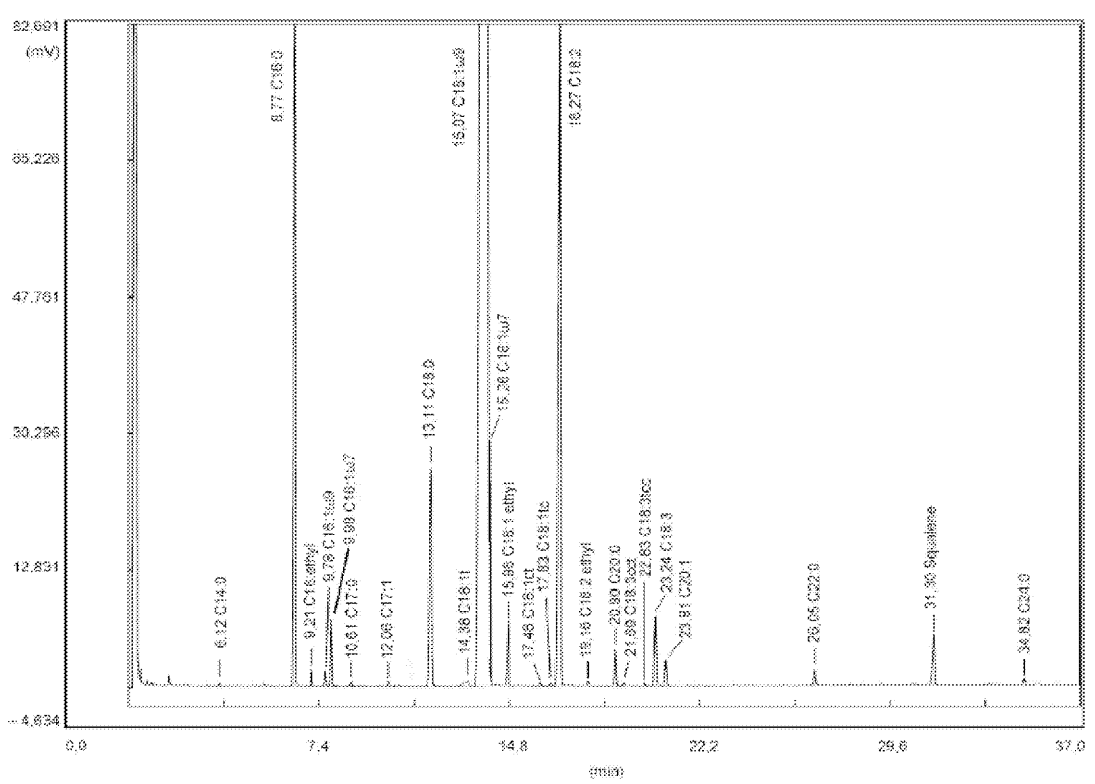


▼ M28

Προσάρτημα Β

Σχήμα 1

Χρωματογραφικό προφίλ πυρηνελαίου, ληφθέν με τη μέθοδο της μεθυλίωσης εν ψυχρό



Οι χρωματογραφικές κορυφές αντιστοιχούν στους μεθυλεστέρες, εκτός αν υποδεικνύεται διαφορετικά.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XI

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

1. ΑΡΧΗ

Αεριοχρωματογραφική ανάλυση σύμφωνα με την τεχνική «head space».
2. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ
 - 2.1. Συσκευή αερίου χρωματογραφίας, με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).
 - 2.2. Συσκευή «head space».
 - 2.3. Στήλη αερίου χρωματογραφίας από γυαλί μήκους 2 μέτρων και διαμέτρου 2 mm, ►C1 με στατική φάση ◄. OV101 ως 10 % ή ισοδύναμο, που εμποτίζει γη διατόμων, η οποία έχει αποτεφρωθεί, εκπλυθεί με οξέα και μετατραπεί σε σιλάνιο, κοκκομετρικού βαθμού 80 ως 100 Mesh.
 - 2.4. Φέρον αέριο και βοηθητικό αέριο: άζωτο για αέριο χρωματογραφία, ►C1 κατάλληλο για ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων ◄.
 - 2.5. Γυάλινα φιαλίδια 10 ως 15 ml, με επένδυση από τεφλόν και ένα 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.

▼ **M26**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΧΙΙ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΔΙΕΘΝΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ ΕΛΑΙΟΚΟΜΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ▼ **M28**

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η διεθνής μέθοδος που περιγράφεται στο παρόν παράρτημα αποβλέπει στον καθορισμό, αφενός της διαδικασίας αξιολόγησης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του παρθένου ελαιολάδου, κατά την έννοια του σημείου 1 του μέρους VIII του παραρτήματος VII του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1308/2013 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου⁽¹⁾, και, αφετέρου, της διαδικασίας ταξινόμησης των παρθένων ελαιολάδων βάσει των εν λόγω χαρακτηριστικών. Η μέθοδος περιλαμβάνει επίσης ενδείξεις για προαιρετική επίσημανση.

Η περιγραφόμενη μέθοδος ισχύει μόνο για τα παρθένα ελαιόλαδα και για την ταξινόμηση και επίσημάνσή τους με βάση την ένταση των αντιληπτών ελαττωμάτων και του φρουτώδους, που προσδιορίζονται από ομάδα δοκιμαστών οι οποίοι επιλέγονται, εκπαιδεύονται και ελέγχονται ως ομάδα.

Τα πρότυπα IOC (Διεθνές Συμβούλιο Ελαιοκομίας) που αναφέρονται στο παρόν παράρτημα χρησιμοποιούνται στην τελευταία διαθέσιμη έκδοσή τους.

▼ **M26**2. ΓΕΝΙΚΟ ΒΑΣΙΚΟ ΛΕΞΙΛΟΓΙΟ ΤΗΣ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ
ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Βλ. πρότυπο IOC/T.20/Doc. No 4 «Sensory Analysis: General Basic Vocabulary» (Οργανοληπτική ανάλυση: Γενικό βασικό λεξιλόγιο)

3. ΕΙΔΙΚΟ ΛΕΞΙΛΟΓΙΟ

3.1. **Αρνητικές ιδιότητες**

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

Μουχλιασμένο- νοτισμένο-χοματίλα: Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από καρπούς προσβεβλημένους σε μεγάλη έκταση από μύκητες και ζυμομύκητες, λόγω της αποθήκευσής τους επί πολλές ημέρες σε υγρό περιβάλλον, ή ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές οι οποίες συλλέχθηκαν μαζί με χώμα ή λάσπη και δεν πλύθηκαν.

Κρασώδες-ξυδάτο- ξινό-ξινισμένο: Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ορισμένων ελαιολάδων που θυμίζει κρασί ή ξύδι. Οφείλεται κυρίως σε διεργασία αερόβιας ζύμωσης των ελιών ή υπολειμμάτων ελαιοζύμης σε σάκους (τάπητες) ελαιοπιεστήριου που δεν καθαρίστηκαν σωστά, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό οξικού οξέος, οξικού αιθυλεστέρα και αιθανόλης.

Ταργό: Οσμή-γεύση των ελαιολάδων που έχουν υποστεί έντονη οξειδωση.

Παγωμένης ελιάς (υγρό ξύλο): Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδων που έχουν παραχθεί από ελιές οι οποίες επλήγησαν από παγετό πάνω στο δένδρο.

⁽¹⁾ Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 1308/2013 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 17ης Δεκεμβρίου 2013, για τη θέσπιση κοινής οργάνωσης των αγορών γεωργικών προϊόντων και την κατάργηση των κανονισμών (ΕΟΚ) αριθ. 922/72, (ΕΟΚ) αριθ. 234/79, (ΕΚ) αριθ. 1037/2001 και (ΕΚ) αριθ. 1234/2007 του Συμβουλίου (ΕΕ L 347 της 20.12.2013, σ. 671).

▼ **M28**

3.1.1. Άλλες αρνητικές ιδιότητες

<i>Ψημένο ή καμένο</i>	Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδων προερχόμενη από υπερβολική και/ή παρατεταμένη θέρμανση κατά την επεξεργασία και, ιδιαίτερα, κατά τη θερμομάλαξη της ελαιοζύμης, όταν αυτή πραγματοποιείται σε ακατάλληλες θερμικές συνθήκες.
<i>Άχυρο-ξύλο</i>	Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ορισμένων ελαιολάδων που προέρχονται από ελιές οι οποίες έχουν αφυδατωθεί.
<i>Τραχύ</i>	Πηχτή και ζυμώδης αίσθηση που παράγεται στο στόμα από ορισμένα παλαιά έλαια.
<i>Γράσο</i>	Οσμή-γεύση ελαιολάδου που θυμίζει πετρέλαιο, λιπαντικά ή ορυκτέλαια.
<i>Φυτικά υγρά</i>	Οσμή-γεύση που αποκτάται από το ελαιόλαδο ύστερα από παρατεταμένη επαφή του με φυτικά υγρά του ελαιοτριβείου τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση.
<i>Άλμη</i>	Οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές διατηρημένες σε άλμη.
<i>Μεταλλικό</i>	Οσμή-γεύση που θυμίζει μέταλλο. Είναι χαρακτηριστική ιδιότητα ελαιολάδου που έχει παραμείνει επί μακρόν σε επαφή με μεταλλικές επιφάνειες, κατά τη θραύση του ελαιοκάρπου, τη μάλαξη, την έκθλιψη ή την αποθήκευση.
<i>Σπάρτο</i>	Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές οι οποίες έχουν υποστεί έκθλιψη σε καινούριους σάκους ελαιοπιεστηρίου από σπάρτο. Μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το αν πρόκειται για σάκους κατασκευασμένους από γλωρό ή από αποξηραμένο σπάρτο.
<i>Σκουληκιασμένο</i>	Οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές οι οποίες έχουν προσβληθεί σοβαρά από νύμφες δάκου (<i>Bactrocera oleae</i>).
<i>Αγγορρόδες</i>	Οσμή-γεύση ελαιολάδου η οποία οφείλεται σε υπερβολικά μακρόχρονη ερμητική συσκευασία, και ειδικότερα σε λευκοσιδηρά δοχεία, και αποδίδεται στον σχηματισμό 2,6-εννεαδιενάλης.

3.2. Θετικές ιδιότητες

<i>Φρουτώδες</i>	Σύνολο οσφραντικών αισθήσεων χαρακτηριστικών των ελαιολάδων, το οποίο εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς και προέρχεται από υγιείς και φρέσκες ελιές, ώριμες ή άγουρες. Γίνεται αντιληπτό απευθείας με την όσφρηση και/ή από την οπισθορινική οδό.
<i>Πικρό</i>	Χαρακτηριστική πρωταρχική γεύση ελαιολάδου που έχει ληφθεί από πράσινες ελιές ή από ελιές των οποίων το χρώμα αρχίζει να αλλάζει. Γίνεται αντιληπτή μέσω των περιχαρακωμένων γευστικών θηλών που σχηματίζουν το γευστικό λάμδα της γλώσσας.
<i>Πικάντικο</i>	Καυστική απτική αίσθηση, χαρακτηριστική των ελαιολάδων που παράγονται στην αρχή της ελαιοκομικής περιόδου, κυρίως από ελιές που είναι ακόμη άγουρες. Μπορεί να γίνει αντιληπτή σε όλη τη στοματική κοιλότητα, ιδίως στον φάρυγγα.

▼ **M32**

3.3. Προαιρετική ορολογία για την επισήμανση

Κατόπιν αιτήματος, ο επικεφαλής της ομάδας των δοκιμαστών μπορεί να πιστοποιήσει ότι τα αξιολογηθέντα ελαιόλαδα ανταποκρίνονται στους ορισμούς και στα πεδία τιμών που αντιστοιχούν στους ακόλουθους επιθετικούς προσδιορισμούς, ανάλογα με την ένταση και την αντίληψη των ιδιοτήτων.

▼ **M32**

Θετικές ιδιότητες (φρουτώδες, πικρό και πικάντικο). Ανάλογα με την ένταση της αντίληψης:

- *έντονο*, όταν η διάμεση τιμή της ιδιότητας υπερβαίνει το 6,0·
- *μεσαίο*, όταν η διάμεση τιμή της ιδιότητας είναι άνω του 3,0 και μικρότερη ή ίση του 6,0·
- *απαλό*, όταν η διάμεση τιμή της ιδιότητας είναι μικρότερη ή ίση του 3,0.

<i>Φρουτώδες</i>	Σύνολο οσφραντικών αισθήσεων χαρακτηριστικών των ελαιολάδων, το οποίο εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς και προέρχεται από υγιείς και φρέσκες ελιές, όπου δεν κυριαρχεί ούτε το άγουρο ούτε το ώριμο φρουτώδες. Γίνεται αντιληπτό απευθείας με την όσφρηση και/ή από την οπισθορινική οδό.
<i>Άγουρο φρουτώδες</i>	Σύνολο οσφραντικών αισθήσεων χαρακτηριστικών των ελαιολάδων, το οποίο θυμίζει άγουρο καρπό, εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς και προέρχεται από πράσινες, υγιείς και φρέσκες ελιές. Γίνεται αντιληπτό απευθείας με την όσφρηση και/ή από την οπισθορινική οδό.
<i>Ωριμο φρουτώδες</i>	Σύνολο οσφραντικών αισθήσεων χαρακτηριστικών των ελαιολάδων, το οποίο θυμίζει ώριμο καρπό, εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς και προέρχεται από υγιείς και φρέσκες ελιές. Γίνεται αντιληπτό απευθείας με την όσφρηση και/ή από την οπισθορινική οδό.
<i>Ισορροπημένο</i>	Έλαιο που δεν παρουσιάζει έλλειψη ισορροπίας. Ως έλλειψη ισορροπίας νοείται η αίσθηση όσφρησης, γεύσης και αφής όπου η διάμεση τιμή της ιδιότητας του πικρού και η διάμεση τιμή της ιδιότητας του πικάντικου δεν υπερβαίνει περισσότερο από 2,0 μονάδες τη διάμεση τιμή της ιδιότητας του φρουτώδους.
<i>Ήπιο ελαιόλαδο</i>	Ελαιόλαδο στο οποίο η διάμεση τιμή της ιδιότητας του πικρού και η διάμεση τιμή της ιδιότητας του πικάντικου είναι μικρότερες ή ίσες με 2,0.

Κατάλογος όρων ανάλογα με την ένταση της αντίληψης:

Όροι που υπόκεινται στην προσκόμιση πιστοποιητικού οργανοληπτικής εξέτασης	Διάμεση τιμή ($\Delta\tau$) της ιδιότητας
Φρουτώδες	—
Ωριμο φρουτώδες	—
Άγουρο φρουτώδες	—
Απαλό φρουτώδες	$\leq 3,0$
Μέτριο φρουτώδες	$3,0 < \Delta\tau \leq 6,0$
Έντονο φρουτώδες	$> 6,0$
Απαλό ώριμο φρουτώδες	$\leq 3,0$
Μέτριο ώριμο φρουτώδες	$3,0 < \Delta\tau \leq 6,0$
Έντονο ώριμο φρουτώδες	$> 6,0$
Απαλό άγουρο φρουτώδες	$\leq 3,0$
Μέτριο άγουρο φρουτώδες	$3,0 < \Delta\tau \leq 6,0$

▼ **M32**

Όροι που υπόκεινται στην προσκόμιση πιστοποιητικού οργανοληπτικής εξέτασης	Διάμεση τιμή ($\Delta\tau$) της ιδιότητας
Έντονο άγουρο φρουτώδες	$> 6,0$
Απαλό πικρό	$\leq 3,0$
Μέτριο πικρό	$3,0 < \Delta\tau \leq 6,0$
Έντονο πικρό	$> 6,0$
Απαλό πικάντικο	$\leq 3,0$
Μέτριο πικάντικο	$3,0 < \Delta\tau \leq 6,0$
Έντονο πικάντικο	$> 6,0$
Ισορροπημένο έλαιο	Η διάμεση τιμή της ιδιότητας του πικρού και η διάμεση τιμή της ιδιότητας του πικάντικου δεν υπερβαίνει περισσότερο από 2,0 μονάδες τη διάμεση τιμή της ιδιότητας του φρουτώδους.
Ήπιο ελαιόλαδο	Η διάμεση τιμή της ιδιότητας του πικρού και η διάμεση τιμή της ιδιότητας του πικάντικου είναι μικρότερες ή ίσες με 2,0.

▼ **M26**

4. ΠΟΤΗΡΙ ΓΙΑ ΤΗ ΓΕΥΣΙΓΝΩΣΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΛΑΙΩΝ
Βλ. πρότυπο IOC/T.20/Doc. No 5 «Glass for Oil Tasting» (Ποτήρι για τη γευσιγνωστική δοκιμασία ελαίων).
5. ΑΙΘΟΥΣΑ ΓΕΥΣΙΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ
Βλ. πρότυπο IOC/T.20/Doc. No 6 «Guide for the Installation of a Test Room» (Οδηγός για την εγκατάσταση αίθουσας γευσιγνωστικής δοκιμασίας).
6. ΥΛΙΚΟ
Κάθε θάλαμος πρέπει να είναι εφοδιασμένος με το ακόλουθο υλικό, το οποίο απαιτείται για την ορθή εκτέλεση των καθηκόντων των δοκιμαστών και πρέπει να είναι εύκολα προσίτο:
 - ποτήρια (τυποποιημένα) που περιέχουν τα δείγματα, φέρουν κωδικό αριθμό, καλύπτονται με υάλους ωρολογίου και διατηρούνται σε θερμοκρασία $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - φύλλο χαρακτηρισμού (βλ. σχήμα 1), σε έντυπη ή ηλεκτρονική μορφή, υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται οι προϋποθέσεις του φύλλου χαρακτηρισμού, μαζί με τις οδηγίες χρήσης του, εάν είναι απαραίτητο.
 - στυλό διαρκείας ή με ανεξίτηλο μελάνι.
 - δίσκοι με φέτες μήλου και/ή νερό, ανθρακούχο ή μη, και/ή φρυγανιές.
 - ένα ποτήρι νερό σε θερμοκρασία δωματίου.
 - φύλλο στο οποίο υπενθυμίζονται οι γενικοί κανόνες που παρατίθενται στις ενότητες 8.4 και 9.1.1.
 - πτυελοδοχείο.

▼ **M26****7. ΕΠΙΚΕΦΑΛΗΣ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΔΟΚΙΜΑΣΤΩΝ ΚΑΙ ΔΟΚΙΜΑΣΤΕΣ****7.1. Επικεφαλής της ομάδας**

Ο επικεφαλής της ομάδας δοκιμαστών πρέπει να είναι κατάλληλα εκπαιδευμένο πρόσωπο με άρτια γνώση των ειδών ελαιολάδου που πρόκειται να εξετάσει στο πλαίσιο της εργασίας του. Αποτελεί το βασικό πρόσωπο της ομάδας και είναι υπεύθυνος για την οργάνωση και τη λειτουργία της.

Η εργασία του επικεφαλής της ομάδας απαιτεί βασική κατάρτιση στα εργαλεία οργανοληπτικής ανάλυσης, οξύτητα των αισθήσεων, σχολαστική προετοιμασία, οργάνωση και διεξαγωγή των δοκιμασιών, καθώς και δεξιότητες και υπομονή για τον σχεδιασμό και την εκτέλεση των δοκιμασιών με επιστημονικό τρόπο.

Είναι ο μόνος υπεύθυνος για την επιλογή, την κατάρτιση και την παρακολούθηση των δοκιμαστών προκειμένου να διαπιστώνει το επίπεδο των δεξιοτήτων τους. Ως εκ τούτου, είναι υπεύθυνος για τις εκτιμήσεις των δοκιμαστών, που πρέπει να είναι πάντα αντικειμενικές. Για τον σκοπό αυτό, πρέπει να εκπονεί ειδικές διαδικασίες βασιζόμενες σε δοκιμασίες και σαφή κριτήρια αποδοχής και απόρριψης. Βλ. πρότυπο IOC/T.20/Doc. No 14 «Guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil tasters» (Οδηγός για την επιλογή, την κατάρτιση και την παρακολούθηση ειδικευμένων δοκιμαστών ελαιολάδου).

Ο επικεφαλής της ομάδας είναι υπεύθυνος για τις επιδόσεις της και, συνεπώς, για την αξιολόγησή της, για την οποία πρέπει να παρέχει αξιόπιστα και αντικειμενικά αποδεικτικά στοιχεία. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να μπορεί να αποδεικνύει ανά πάσα στιγμή ότι η χρησιμοποιημένη μέθοδος και οι δοκιμαστές ελέγχονται. Συνιστάται η περιοδική βαθμολόγηση της ομάδας (πρότυπο IOC/T.20/Doc. No 14, παράγραφος 5).

Φέρει την τελική ευθύνη για την τήρηση των αρχείων της ομάδας. Τα αρχεία αυτά πρέπει να είναι πάντα ανιχνεύσιμα. Πρέπει να πληρούν τις απαιτήσεις διασφάλισης και ποιότητας που καθορίζονται στα διεθνή πρότυπα οργανοληπτικής ανάλυσης και να εξασφαλίζουν σε κάθε περίπτωση την ανωνυμία των δειγμάτων.

Ο επικεφαλής της ομάδας είναι υπεύθυνος για την καταγραφή των εργαλείων και του εξοπλισμού που είναι απαραίτητα για τη συμμόρφωση με τις προδιαγραφές της παρούσας μεθόδου, καθώς και για τη διασφάλιση του ότι αυτά καθαρίζονται και συντηρούνται δεόντως. Ο επικεφαλής φυλάσσει γραπτές αποδείξεις των ανωτέρω, καθώς και της τήρησης των συνθηκών δοκιμασίας.

Είναι αρμόδιος για την παραλαβή και τη φύλαξη των δειγμάτων μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο, καθώς και για την αποθήκευσή τους μετά τη δοκιμασία. Κατά την εκτέλεση των ανωτέρω καθηκόντων, διασφαλίζει σε κάθε περίπτωση ότι όλα τα δείγματα παραμένουν ανώνυμα και ότι αποθηκεύονται με τον ενδεδειγμένο τρόπο. Για τον σκοπό αυτόν, οφείλει να εκπονεί γραπτές διαδικασίες προκειμένου να διασφαλίζεται ότι η όλη διαδικασία είναι ανιχνεύσιμη και παρέχει εγγυήσεις.

Επιπλέον, ο επικεφαλής της ομάδας είναι υπεύθυνος για την προετοιμασία, την κωδικοποίηση και την παρουσίαση των δειγμάτων στους δοκιμαστές, σύμφωνα με τον ενδεδειγμένο πειραματικό σχεδιασμό βάσει προκαθορισμένων πρωτοκόλλων, καθώς και για τη συγκέντρωση και τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που παρέχουν οι δοκιμαστές.

Είναι αρμόδιος για την εκπόνηση και την κατάρτιση τυχόν άλλων διαδικασιών που ενδεχομένως είναι απαραίτητες για τη συμπλήρωση του παρόντος προτύπου και τη διασφάλιση της εύρυθμης λειτουργίας της ομάδας.

Πρέπει να αναζητεί τρόπους σύγκρισης των αποτελεσμάτων της ομάδας του με τα αποτελέσματα άλλων ομάδων που αναλαμβάνουν την ανάλυση παρθένων ελαιολάδων, προκειμένου να βεβαιώνεται για την εύρυθμη λειτουργία της ομάδας του.

▼ **M26**

Είναι καθήκον του επικεφαλής της ομάδας να εμπνυχώνει τα μέλη της, κεντρίζοντας το ενδιαφέρον και την περιέργειά τους και καλλιεργώντας ανταγωνιστικό πνεύμα μεταξύ τους. Για να το επιτύχει αυτό ο επικεφαλής, συνιστάται ένθερμα να εξασφαλίζει ομαλή αμφίδρομη ροή πληροφοριών με τα μέλη της ομάδας, ενημερώνοντάς τα για όλα τα καθήκοντα που εκτελεί και τα αποτελέσματα που επιτυγχάνονται. Επιπρόσθετα, διασφαλίζει ότι η γνώμη του δεν γίνεται γνωστή και εμποδίζει τους δοκιμαστές με πιθανές αρχηγικές τάσεις να επιβάλλουν τα κριτήριά τους στους υπόλοιπους δοκιμαστές.

Ο επικεφαλής της ομάδας συγκαλεί τους δοκιμαστές αρκετά πριν από τη διενέργεια των δοκιμασιών και απαντά σε τυχόν ερωτήσεις τους σχετικά με την εκτέλεση των δοκιμασιών, χωρίς όμως να εκφράζει γνώμη σχετικά με το δείγμα.

▼ **M28**7.1.1. *Αναπληρωτής επικεφαλής της ομάδας*

Ο επικεφαλής της ομάδας μπορεί, για βάσιμους λόγους, να αντικατασταθεί από αναπληρωτή επικεφαλής της ομάδας, ο οποίος μπορεί να τον αντικαθιστά σε καθήκοντα που αφορούν την εκτέλεση των δοκιμών. Ο αναπληρωτής αυτός πρέπει να διαθέτει όλα τα απαραίτητα προσόντα που απαιτούνται από έναν επικεφαλής της ομάδας.

7.2. **Δοκιμαστές**

Τα άτομα που μετέχουν ως δοκιμαστές στις οργανοληπτικές δοκιμασίες ελαιολάδων πρέπει να ενεργούν εθελοντικά. Ως εκ τούτου, είναι σκόπιμο να υποβάλλουν οι υποψήφιοι γραπτή αίτηση. Οι υποψήφιοι επιλέγονται, εκπαιδεύονται και παρακολουθούνται από τον επικεφαλής της ομάδας με βάση την ικανότητά τους να διακρίνουν μεταξύ ομοειδών δειγμάτων. Υπενθυμίζεται ότι η ακρίβεια των εκτιμήσεών τους βελτιώνεται με την κατάρτιση.

Οι δοκιμαστές πρέπει να ενεργούν ως πραγματικοί αισθητηριακοί παρατηρητές, παραβλέποντας τις προσωπικές γευστικές προτιμήσεις τους και αναφέροντας αποκλειστικά τις αισθήσεις που αντιλαμβάνονται. Για να το επιτύχουν αυτό, πρέπει να εργάζονται πάντα σιωπηλά, ήρεμα και χωρίς βιασύνη, εστιάζοντας στον μέγιστο δυνατό βαθμό τις αισθήσεις τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του δείγματος που δοκιμάζουν.

Για κάθε δοκιμασία απαιτούνται 8 έως 12 δοκιμαστές. Ωστόσο, συνιστάται να προβλέπονται ορισμένοι επιπλέον δοκιμαστές προκειμένου να καλύψουν τυχόν απουσίες.

▼ **M26**8. **ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ**8.1. **Παρουσίαση του δείγματος**

Το δείγμα ελαίου προς ανάλυση παρουσιάζεται σε τυποποιημένα ποτήρια γευστηριακής δοκιμασίας που συμμορφώνονται με το πρότυπο IOC/T.20/Doc. No 5 «Glass for Oil Tasting».

Το ποτήρι περιέχει 14–16 ml ελαίου, ή 12,8 έως 14,6 g ελαίου εάν πρόκειται να ζυγιστούν τα δείγματα, και καλύπτεται με ύαλο ωρολογίου.

Κάθε ποτήρι σημειώνεται με κωδικό ο οποίος αποτελείται είτε από αριθμούς είτε από συνδυασμό γραμμμάτων και αριθμών που επιλέγονται τυχαία. Ο κωδικός σημειώνεται με άοσμο σύστημα σήμανσης.

8.2. **Θερμοκρασία δοκιμασίας και δείγματος**

Τα προς γευστηριακή δοκιμασία δείγματα ελαίου διατηρούνται στα ποτήρια σε θερμοκρασία $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ καθόλη τη διάρκεια της δοκιμασίας. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία έχει επιλεγεί επειδή διευκολύνει την παρατήρηση οργανοληπτικών διαφορών σε σύγκριση με τη θερμοκρασία δωματίου και επειδή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες οι αρωματικές ενώσεις που χαρακτηρίζουν τα εν λόγω έλαια εξατμίζονται ασθενώς, ενώ οι υψηλότερες θερμοκρασίες οδηγούν στον σχηματισμό των πτητικών ενώσεων που αποτελούν ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των θερμών ελαίων. Σχετικά με τη μέθοδο που πρέπει να χρησιμοποιείται για τη θέρμανση των δειγμάτων όταν έχουν τοποθετηθεί στα ποτήρια, βλ. πρότυπο IOC/T.20/Doc. No 5 «Glass for Oil Tasting».

▼ **M26**

Η θερμοκρασία της αίθουσας γευστηγωστικής δοκιμασίας πρέπει να είναι 20° έως 25 °C (βλ. πρότυπο IOC/T.20/Doc. No 6).

8.3. **Ωρες διεξαγωγής των δοκιμασιών**

Οι βέλτιστες ώρες εργασίας για τη δοκιμασία ελαίων είναι οι πρωινές. Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχουν διαστήματα κατά τη διάρκεια της ημέρας όπου η αντίληψη της γεύσης και της οσμής είναι καλύτερη. Για ένα διάστημα πριν από τα γεύματα οι αισθήσεις της όσφρησης και της γεύσης είναι οξύτερες, ενώ μετά τα γεύματα εξασθενίζουν.

Εντούτοις, αυτό το κριτήριο δεν πρέπει να εφαρμόζεται σε βαθμό τέτοιο ώστε η πείνα να αποσπά την προσοχή των δοκιμαστών, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η διακριτική τους ικανότητα. Συνεπώς, συνιστάται να πραγματοποιούνται οι συνεδρίες γευστηγωστικής δοκιμασίας το πρωί, μεταξύ των ωρών 10.00 και 12.00.

8.4. **Δοκιμαστές: γενικοί κανόνες δεοντολογίας**

Οι κατωτέρω συστάσεις αφορούν τη συμπεριφορά των δοκιμαστών κατά τη διάρκεια της εργασίας τους.

Οι δοκιμαστές που καλούνται από τον επικεφαλής της ομάδας να συμμετάσχουν σε οργανοληπτική δοκιμασία θα πρέπει να μπορούν να παραστούν τις καθορισμένες ώρες και οφείλουν να τηρούν τους ακόλουθους κανόνες:

- Να μην καπνίζουν ούτε να πίνουν καφέ τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από την καθορισμένη ώρα της δοκιμασίας.
- Να μη χρησιμοποιούν άρωμα, καλλυντικό ή σαπούνι του οποίου η οσμή θα μπορούσε να παραμείνει έως τον χρόνο διεξαγωγής της δοκιμασίας. Να χρησιμοποιούν σαπούνι χωρίς άρωμα για να πλένουν τα χέρια τους, τα οποία θα πρέπει στη συνέχεια να ξεπλένουν καλά και να στεγνώνουν όσες φορές είναι απαραίτητο για να εξαλειφθεί κάθε ίχνος οσμής.
- Να μην τρώνε τίποτα τουλάχιστον μία ώρα πριν από τη διεξαγωγή της γευστηγωστικής δοκιμασίας.
- Εάν οι δοκιμαστές δεν αισθάνονται καλά σωματικά και, συγκεκριμένα, εάν επηρεάζεται η αίσθηση της όσφρησης και της γεύσης τους, ή εάν βρίσκονται υπό ψυχολογική πίεση που τους εμποδίζει να συγκεντρωθούν στην εργασία τους, πρέπει να μην συμμετέχουν στη γευστηγωστική δοκιμασία και να ειδοποιούν σχετικά τον επικεφαλής της ομάδας.
- Εφόσον οι δοκιμαστές τηρούν τους ανωτέρω κανόνες, καταλαμβάνουν τη θέση τους στον καθορισμένο θάλαμο με τάξη και ησυχία.
- Διαβάζουν προσεκτικά τις οδηγίες που παρέχονται στο φύλλο χαρακτηρισμού και αρχίζουν να εξετάζουν το δείγμα μόνον αφού προηγουμένως έχουν προετοιμαστεί πλήρως για την εργασία που καλούνται να εκτελέσουν (ήρεμα και χωρίς βιασύνη). Σε περίπτωση αμφιβολίας, θα πρέπει να συμβουλευθούν κατ' ιδίαν τον επικεφαλής της ομάδας.
- Πρέπει να παραμένουν σιωπηλοί κατά την εκτέλεση των καθηκόντων τους.
- Πρέπει να έχουν απενεργοποιημένο το κινητό τους τηλέφωνο καθόλη τη διάρκεια της δοκιμασίας ώστε να μην αποσπούν την προσοχή των συναδέλφων τους και να μην τους ενοχλούν.

9. **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ**9.1. **Τεχνική γευστηγωστικής δοκιμασίας**▼ **M29**

- 9.1.1. Οι δοκιμαστές σηκώνουν το ποτήρι, κρατώντας το καλυμμένο με την ύαλο ωρολογίου, το γέρνουν ελαφρά και σε αυτή τη θέση το περιστρέφουν πλήρως, ώστε να διαβραχεί όσο το δυνατόν περισσότερο η εσωτερική επιφάνεια. Μόλις ολοκληρωθεί αυτό το στάδιο, αφαιρούν την ύαλο ωρολογίου και οσφραίνονται το δείγμα με αργές, βαθιές εισπνοές για να αξιολογήσουν το ελαιόλαδο. Η διάρκεια της όσφρησης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 30 δευτερόλεπτα. Εάν κατά τη διάρκεια αυτού του διαστήματος οι δοκιμαστές δεν καταλήξουν σε κανένα συμπέρασμα, πρέπει να κάνουν ένα σύντομο διάλειμμα και μετά να επαναλάβουν την προσπάθεια.

▼ **M29**

Αφού πραγματοποιηθεί η οσφρητική δοκιμασία, οι δοκιμαστές αξιολογούν τις αισθήσεις που δημιουργεί το έλαιο στο στόμα (σύνολο των αισθήσεων όσφρησης-γεύσης-αφής από την οπισθορινική οδό). Για τον σκοπό αυτό, βάζουν στο στόμα τους μια μικρή ποσότητα ελαίου, 3 ml περίπου. Είναι πολύ σημαντικό να κατανέμεται το έλαιο σε όλη τη στοματική κοιλότητα, από το πρόσθιο τμήμα του στόματος και της γλώσσας, στα πλάγια και στο οπίσθιο τμήμα τους έως την υπερώα και τον φάρυγγα, καθώς είναι γνωστό ότι η ένταση με την οποία γίνονται αντιληπτές οι γεύσεις και οι απτικές αισθήσεις διαφέρει ανάλογα με τη ζώνη της γλώσσας, της υπερώας και του φάρυγγα.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι είναι αναγκαίο να διασκορπίζεται το έλαιο, σε επαρκή ποσότητα και πολύ αργά, πάνω από το οπίσθιο τμήμα της γλώσσας μέχρι την υπερώα και τον φάρυγγα, ενώ οι δοκιμαστές επικεντρώνουν την προσοχή τους στη σειρά εμφάνισης των ερεθισμάτων «πικρό» και «πικάντικο». Σε αντίθετη περίπτωση, σε ορισμένα έλαια και τα δύο αυτά ερεθίσματα μπορεί να περάσουν απαρατήρητα, ενώ σε άλλα, το ερέθισμα «πικρό» μπορεί να συγκαλύπτεται από το ερέθισμα «πικάντικο».

Οι μικρές και διαδοχικές εισπνοές αέρα από το στόμα επιτρέπουν στον δοκιμαστή όχι μόνο να διασκορπίσει το δείγμα σε όλη τη στοματική κοιλότητα, αλλά και να αντιληφθεί τις πτητικές αρωματικές ενώσεις με το πίσω μέρος της ρινικής κοιλότητας, επιβάλλοντας τη χρήση αυτής της οδού.

Σημείωση: Όταν οι δοκιμαστές δεν αντιλαμβάνονται την ιδιότητα του φρουτώδους σε ένα δείγμα και η ένταση της αρνητικής ιδιότητας είναι 3,5 ή μικρότερη, ο επικεφαλής της ομάδας μπορεί να αποφασίσει την επανάληψη της ανάλυσης του δείγματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος από τους δοκιμαστές (COI/T.20/Doc. No 6/Rev. 1 Σεπτεμβρίου 2007, τμήμα 3 — Γενικές προδιαγραφές για την εγκατάσταση αίθουσας γευστηριωτικής δοκιμασίας) διευκρινίζοντας ταυτόχρονα το πλαίσιο και την έννοια της θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Όταν το δείγμα θα αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου, οι δοκιμαστές θα πρέπει να ελέγξουν εκ νέου μόνον κατά πόσον γίνεται αντιληπτή η ιδιότητα του φρουτώδους. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να καταγράψουν την ένταση στην κλίμακα.

Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η αίσθηση αφής του πικάντικου. Για τον σκοπό αυτό, συνιστάται η κατάποση του ελαίου.

▼ **M26**

- 9.1.2. Κατά την οργανοληπτική εξέταση παρθένου ελαιολάδου, συνιστάται να αξιολογούνται το πολύ ΤΕΣΣΕΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ σε κάθε συνεδρία, με ανώτατο όριο τις τρεις συνεδρίες ημερησίως, προκειμένου να αποφεύγεται η αντίθεση που θα μπορούσε να προκληθεί από τη γευστηριωτική δοκιμασία άλλων δειγμάτων αμέσως.

Καθώς στις διαδοχικές γευστηριωτικές δοκιμασίες προκαλείται κόπωση ή απώλεια της ευαισθησίας από τα δείγματα που έχουν προηγηθεί, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείται ένα προϊόν ικανό να εξαλείψει από το στόμα τα υπολείμματα του ελαιολάδου της προηγούμενης γευστηριωτικής δοκιμασίας.

Συνιστάται να χρησιμοποιείται μια λεπτή φέτα μήλου, την οποία αφού μασήσει ο δοκιμαστής μπορεί να την πετάξει στο πτυελοδοχείο. Στη συνέχεια, ο δοκιμαστής ξεπλένει το στόμα του με λίγο νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον 15 λεπτά από τη λήξη μιας συνεδρίας έως την έναρξη της επόμενης.

- 9.2. **Χρήση του φύλλου χαρακτηρισμού από τους δοκιμαστές**

Το φύλλο χαρακτηρισμού που προορίζεται για χρήση από τους δοκιμαστές περιγράφεται λεπτομερώς στο σχήμα 1 του παρόντος παραρτήματος.

Κάθε δοκιμαστής της ομάδας οσφραίνεται και έπειτα γεύεται το εξεταζόμενο ελαιόλαδο⁽¹⁾. Στη συνέχεια, καταγράφει στην κλίμακα των 10 cm που υπάρχει στο φύλλο χαρακτηρισμού που έχει στη διάθεσή του την ένταση με την οποία αντιλαμβάνεται καθεμία από τις αρνητικές και θετικές ιδιότητες.

⁽¹⁾ Οι δοκιμαστές μπορούν να μην δοκιμάζουν το έλαιο, όταν παρατηρούν μέσω της όσφρησης οποιαδήποτε εξαιρετικά έντονη αρνητική ιδιότητα. Στην περίπτωση αυτή καταγράφουν την εξαιρετική αυτή κατάσταση στο φύλλο χαρακτηρισμού.

▼ M26

Εάν οι δοκιμαστές αντιληφθούν αρνητικές ιδιότητες που δεν αναφέρονται στο τμήμα 4, τις καταγράφουν κάτω από την επικεφαλίδα «Άλλες», χρησιμοποιώντας τον όρο ή τους όρους που τις περιγράφουν με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

▼ M28**9.3. Χρήση των δεδομένων από τον επικεφαλής της ομάδας**

Ο επικεφαλής της ομάδας συλλέγει τα φύλλα χαρακτηρισμού που έχουν συμπληρώσει οι δοκιμαστές και εξετάζει τις εντάσεις που έχουν αποδοθεί στις διάφορες ιδιότητες. Σε περίπτωση που εντοπίσει κάποια ανωμαλία, καλεί τον δοκιμαστή να αναθεωρήσει το φύλλο χαρακτηρισμού και, αν κρίνεται αναγκαίο, να επαναλάβει τη δοκιμασία.

Ο επικεφαλής της ομάδας εισάγει τα δεδομένα κάθε μέλους της ομάδας σε πρόγραμμα υπολογιστή παρόμοιο με αυτό που προβλέπεται στο πρότυπο IOC/T.20/Doc. αριθ. 15, με σκοπό τον στατιστικό υπολογισμό των αποτελεσμάτων της ανάλυσης, βάσει υπολογισμού της διάμεσης τιμής τους. Βλ. σημείο 9.4 και το προσάρτημα του παρόντος παραρτήματος. Τα δεδομένα για συγκεκριμένο δείγμα εισάγονται με τη βοήθεια πίνακα αποτελούμενου από εννέα στήλες, οι οποίες αντιστοιχούν στις εννέα αισθητηριακές ιδιότητες, και από η σειρές, οι οποίες αντιστοιχούν στα η μέλη της ομάδας που μετείχαν στη δοκιμασία.

Όταν τουλάχιστον το 50 % των μελών της ομάδας έχει αντιληφθεί ένα ελάττωμα και το έχει καταγράψει κάτω από την επικεφαλίδα «Άλλες», ο επικεφαλής της ομάδας υπολογίζει τη διάμεση τιμή του εν λόγω ελαττώματος και συνάγει την αντίστοιχη ταξινόμηση.

Η τιμή του ανθεκτικού συντελεστή μεταβλητότητας που καθορίζει την ταξινόμηση (ελάττωμα με τη μεγαλύτερη ένταση και ιδιότητα του φρουτώδους) δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20 %.

Σε αντίθετη περίπτωση, ο επικεφαλής της ομάδας οφείλει να επαναλάβει την αξιολόγηση του συγκεκριμένου δείγματος σε άλλη συνεδρία γευστηριακής δοκιμασίας.

Εάν αυτή η κατάσταση προκύπτει συχνά, συνιστάται να παρέχει ο επικεφαλής της ομάδας ειδική πρόσθετη κατάρτιση στους δοκιμαστές (πρότυπο IOC/T.20/Doc. αριθ. 14, παράγραφος 5) και να χρησιμοποιεί τον δείκτη επαναληψιμότητας και τον δείκτη απόκλισης για τον έλεγχο των επιδόσεων (πρότυπο IOC/T.20/Doc. αριθ. 14, παράγραφος 6).

▼ M32**9.4. Ταξινόμηση του ελαίου**

Το έλαιο κατατάσσεται στις κατωτέρω κατηγορίες, ανάλογα με τη διάμεση τιμή των ελαττωμάτων και τη διάμεση τιμή της ιδιότητας του φρουτώδους. Η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων ορίζεται ως η διάμεση τιμή του ελαττώματος που γίνεται αντιληπτό με τη μεγαλύτερη ένταση. Η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων και η διάμεση τιμή του φρουτώδους εκφράζονται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

Το έλαιο κατατάσσεται μέσω σύγκρισης της διάμεσης τιμής των ελαττωμάτων και της διάμεσης τιμής του φρουτώδους με τα πεδία τιμών αναφοράς που παρέχονται κατωτέρω. Τα όρια των εν λόγω πεδίων τιμών έχουν καθοριστεί λαμβανομένου υπόψη του σφάλματος της μεθόδου και, ως εκ τούτου, θεωρούνται απόλυτα. Τα πακέτα λογισμικού δίνουν τη δυνατότητα απεικόνισης της κατάταξης σε πίνακα στατιστικών δεδομένων ή σε γράφημα.

- α) Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο: η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι ίση με 0,0 και η διάμεση τιμή του φρουτώδους είναι μεγαλύτερη του 0,0·
- β) παρθένο ελαιόλαδο: η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι μεγαλύτερη του 0,0 χωρίς όμως να υπερβαίνει το 3,5 και η διάμεση τιμή του φρουτώδους είναι μεγαλύτερη του 0,0·
- γ) μειονεκτικό ελαιόλαδο (λαμπάντε): η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων υπερβαίνει το 3,5 ή η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων είναι μικρότερη ή ίση με 3,5 και η διάμεση τιμή του φρουτώδους είναι ίση με 0,0.

▼ **M32**

Σημείωση 1: Όταν η διάμεση τιμή της ιδιότητας του πικρού και/ή του πικάντικου είναι μεγαλύτερη του 5,0, ο επικεφαλής της ομάδας το σημειώνει στο πιστοποιητικό δοκιμασίας.

Στην περίπτωση αναλύσεων που πραγματοποιούνται στο πλαίσιο παρακολούθησης της συμμόρφωσης, πραγματοποιείται μία δοκιμή. Στην περίπτωση αναλύσεων επανελέγχου, πρέπει να πραγματοποιηθεί διπλή ανάλυση σε χωριστές συνεδρίες γευστιγνωστικής δοκιμασίας. Τα αποτελέσματα της διπλής ανάλυσης πρέπει να είναι στατιστικώς ομοιογενή (βλέπε σημείο 9.5). Σε αντίθετη περίπτωση, το δείγμα πρέπει να αναλυθεί εκ νέου δύο φορές. Η τελική διάμεση τιμή των ιδιοτήτων που λαμβάνονται υπόψη για την κατάταξη, υπολογίζεται με τη χρήση του μέσου όρου των δύο διαμέσεων τιμών.

▼ **M29**9.5. **Κριτήρια για την αποδοχή και απόρριψη των αντιγράφων**

Το κανονικοποιημένο σφάλμα, όπως ορίζεται κατωτέρω, χρησιμοποιείται για να καθορίζεται κατά πόσον τα δύο αποτελέσματα της διπλής ανάλυσης είναι ομοιογενή ή στατιστικώς αποδεκτά:

$$E_n = \frac{|Me_1 - Me_2|}{\sqrt{U_1^2 + U_2^2}}$$

Όταν ME_1 και ME_2 είναι οι διάμεσες τιμές των δύο αναλύσεων (πρώτη και δεύτερη ανάλυση αντίστοιχα) και U_1 και U_2 είναι η διευρυμένη αβεβαιότητα για τις δύο τιμές, υπολογίζονται ως εξής, όπως προσδιορίζεται στο προσάρτημα I:

$$U_1 = c \times s^* \text{ and } s^* = \frac{(CV_r \times Me_1)}{100}$$

Για τη διευρυμένη αβεβαιότητα, $c = 1,96$ · επομένως:

$$U_1 = 0,0196 \times CV_r \times Me_1$$

όπου CV_r είναι ο ανθεκτικός συντελεστής διακύμανσης.

Για να μπορεί να διαπιστωθεί ότι οι δύο τιμές που ελήφθησαν δεν διαφέρουν στατιστικά, το E_n πρέπει να είναι ίσο με ή μικρότερο από 1,0.

▼ **M28**

Σχήμα 1

ΦΥΛΛΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**Ένταση αντίληψης των ελαττωμάτων**

Ατροχάδο/Μούργα	_____
Μουχλιασμένο/νοτισμένο/ χωματίλα	_____
Κρασώδες/ξιδάτο	_____
Ξινό/ξινισμένο	_____
Παγωμένης ελιάς (υγρό ξύλο)	_____
Ταγκό	_____
Άλλες αρνητικές ιδιότητες:	_____
Περιγραφή:	Μεταλλικό <input type="checkbox"/> Άχυρο <input type="checkbox"/> Σκουληκιασμένο <input type="checkbox"/> Τραχύ <input type="checkbox"/> Άλμη <input type="checkbox"/> Ψημένο ή καμένο <input type="checkbox"/> Φυτικά υγρά <input type="checkbox"/> Σπάρτο <input type="checkbox"/> Αγγουρώδες <input type="checkbox"/> Γράσο <input type="checkbox"/>

Ένταση αντίληψης των θετικών ιδιοτήτων

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

Όνομα του δοκιμαστή:

Κωδικός δοκιμαστή:

Κωδικός δείγματος:

Υπογραφή:

Ημερομηνία:

Παρατηρήσεις:

▼ **M26***Προσάρτημα***Μεθοδος υπολογισμού της διαμεσης τιμης και των διαστημάτων εμπιστοσύνης****Διάμεση τιμή**

$$Me = [p (X < x_m) \leq \frac{1}{2} \wedge p (X \leq x_m) \geq \frac{1}{2}]$$

Η διάμεση τιμή ορίζεται ως ο πραγματικός αριθμός X_m που χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι η πιθανότητα (p) να είναι οι τιμές (X) της κατανομής μικρότερες από τον αριθμό αυτόν (X_m) είναι μικρότερη ή ίση με 0,5 και ότι, ταυτόχρονα, η πιθανότητα (p) να είναι οι τιμές (X) της κατανομής μικρότερες ή ίσες με X_m είναι μεγαλύτερη ή ίση με 0,5. Σύμφωνα με έναν πιο πρακτικό ορισμό, η διάμεση τιμή είναι το 50^ο εκατοστημόριο μιας κατανομής αριθμών διατεταγμένων κατ' αύξουσα σειρά. Με πιο απλά λόγια, είναι ο κεντρικός αριθμός ενός συνόλου διατεταγμένων αριθμών των οποίων το πλήθος είναι περιττός αριθμός ή ο μέσος όρος των δύο κεντρικών αριθμών ενός συνόλου διατεταγμένων αριθμών των οποίων το πλήθος είναι άρτιος αριθμός.

Ανθεκτική τυπική απόκλιση

Προκειμένου να εκτιμηθεί αξιόπιστα η μεταβλητότητα γύρω από τη μέση τιμή, είναι απαραίτητη η αναφορά στην ανθεκτική τυπική απόκλιση κατά Stuart και Kendall (4). Ο τύπος εκφράζει την ασυμπτωτική ανθεκτική τυπική απόκλιση, δηλ. την ανθεκτική εκτίμηση της μεταβλητότητας των εξεταζόμενων δεδομένων, όπου N είναι ο αριθμός των παρατηρήσεων και IQR το ενδοτεταρτημοριακό διάστημα, το οποίο περιλαμβάνει ακριβώς το 50% των περιπτώσεων μιας δεδομένης κατανομής πιθανότητας:

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

Το ενδοτεταρτημοριακό εύρος υπολογίζεται με υπολογισμό του μεγέθους της διαφοράς μεταξύ του 75ου και του 25ου εκατοστημορίου.

$$\text{IQR} = 75^\circ - 25^\circ \text{ εκατοστημόριο}$$

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

$$\text{εκατοστημόριο} = [p (X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge p (X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

Πρακτικά, εκατοστημόριο είναι η τιμή κατανομής που αντιστοιχεί σε καθορισμένο εμβαδόν, το οποίο οριοθετείται 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.

Στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου, τα εκατοστημόρια υπολογίζονται βάσει των πραγματικών τιμών που εμφανίζονται στον πίνακα δεδομένων (διαδικασία υπολογισμού εκατοστημορίων).

Ανθεκτικός συντελεστής μεταβλητότητας (%)

Ο $CV_r\%$ αποτελεί καθαρό αριθμό που δείχνει το επί τοις εκατό ποσοστό μεταβλητότητας του αναλυόμενου συνόλου αριθμών. Για τον λόγο αυτόν, ο εν λόγω συντελεστής είναι πολύ χρήσιμος για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των δοκιμασιών της ομάδας.

$$CV_r = \frac{s^*}{Me} \times 100$$

▼ **M26****Διαστήματα εμπιστοσύνης 95% για τη διάμεση τιμή**

Τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% (τιμή του σφάλματος πρώτης τάξης ίση με 0,05 ή 5%) αντιπροσωπεύουν το εύρος εντός του οποίου θα μπορούσε να κυμαίνεται η διάμεση τιμή εάν ήταν δυνατή η επανάληψη του πειράματος άπειρες φορές. Στην πράξη, δείχνουν το εύρος διακύμανσης της δοκιμής υπό τις συνθήκες λειτουργίας που έχουν επιλεγεί, με την παραδοχή ότι είναι δυνατή η επανάληψη της δοκιμασίας πολλές φορές. Όπως και ο *CVr%*, το διάστημα βοηθά στην εκτίμηση της αξιοπιστίας της δοκιμής.

$$C.I_{\text{ανώτ}} = Me + (c \times s^*)$$

$$C.I_{\text{κατώτ}} = Me - (c \times s^*)$$

όπου $C = 1,96$ στην περίπτωση του διαστήματος εμπιστοσύνης 95%.

Παράδειγμα του φύλλου υπολογισμού παρατίθεται στο παράρτημα I του προτύπου IOC/T 20/Doc. No 15.

Βιβλιογραφία

- (1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL.SYSTAT A.E.
- (2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica. Maggioli Editore, Rimini.
- (3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook. Elsevier. Amsterdam.
- (4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1. Hafner Publishing Co.
- (5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots. The American Statistician, 32, (2), 12-16.
- (6) IOC/T.28/Doc. No 1 September 2007, Guidelines for the accreditation of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil according to standard ISO/IEC 17025:2005.
- (7) IOC/T.20/Doc. No 14.
- (8) IOC/T.20/Doc. No 15.
- (9) ISO/IEC 17025:05.

▼ **M20**

▼ **M19**

▼ B

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XV

1. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΕΛΑΙΟ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΠΥΡΗΝΩΝ

1.1. Εξοπλισμός

- κατάλληλη συσκευή εκχυλίσσεως 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 εμφύσησης αέρος ή 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 εκχυλίσσεως και υδρόφιλος βάμβαξ ◄ ή διηθητικός χάρτης, απαλλαγμένα συστατικών εκχυλιζόμενων με το εξάνιο,
- ξηραντήρας,
- κόσκινο διαμέτρου οπών 1 mm,
- μικρά τεμαχίδια ξηρανθείσης ελαφρόπετρας.

1.2. Αντιδραστήρια

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

2. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

2.1. Παρασκευή του δείγματος δοκιμής

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

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

2.2. Ποσότης δοκιμής

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

2.3. Προετοιμασία των εκχυλιστικών δακτυλίων (cartouche)

Τοποθετούμε το δείγμα δοκιμής εντός του δακτύλιου και ποματίζουμε 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 προκαταρκτικά διά τοποθέτησεως του ετοίμου δακτυλίου (ή του διηθητικού χάρτου) επί τι χρονικό διάστημα μέσα σε φούρνο θερμανθέντα σε θερμοκρασία όχι ανώτερη των 80 °C για να ελαττώσουμε την περιεκτικότητα σε υγρασία και πτητικές ύλες κάτω του 10 %.

▼ B**2.5. Προετοιμασία της σφαιρικής φιάλης**

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

2.6. Πρώτη εκχύλιση

Μέσα στη συσκευή 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 ξεπλύνουμε την αρχική φιάλη και το διηθητικό χάρτη αρκετές φορές με εξάνιο. Συλλέγουμε το διήθημα και το διαλύτη της πλύσεως εντός δευτέρας σφαιρικής φιάλης, η οποία έχει προηγουμένως ξηρανθεί και ζυγισθεί με ακρίβεια 1 mg.

2.8. Απομάκρυνση του διαλύτου και ζύγιση του εκχυλίσματος

Απομακρύνουμε το μεγαλύτερο μέρος του διαλύτου δι' αποστάξεως επί ηλεκτρικώς θερμαινόμενου λουτρού. Απομακρύνουμε τα τελευταία ίχνη του διαλύτου θερμαίνοντας τη φιάλη μέσα σε φούρνο στους 103 ± 2 °C για 20 λεπτά. Διευκολύνουμε την απομάκρυνση αυτή είτε δι' 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:

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

▼ B

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

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

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

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

Εκφράζουμε το αποτέλεσμα με ένα δεκαδικό ψηφίο.

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

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

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

U = είναι η 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.

▼ B

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 πόμα, η φιάλη ανακινείται και τοποθετείται σε σκοτεινό μέρος. Για τη λήψη του αντιδραστηρίου Wijs δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί σιφόνιο που απαιτεί αναρρόφηση με το στόμα.

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

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

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

$$\frac{12,69 \text{ c (V}_1 - \text{V}_2)}{\text{m}}$$

όπου:

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

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

▼ B

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

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

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

▼ M11

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XVII

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΣΤΙΓΜΑΣΤΑΔΙΕΝΙΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΛΑΙΑ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

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

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

4. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

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

Σημείωση 1.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες στήλες ανάλογης ή μικρότερης πολικότητας.

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

▼ **M11**

5. ANΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

▼ **M32**

- 5.1. Εξάνιο ή μείγμα αλκανίων σημείου ζέσεως 65-70 °C, αποσταζόμενο σε αποστακτική ύλη. Το εξάνιο μπορεί να αντικατασταθεί από ισοοκτάνιο (2,2,4-τριμεθυλοπεντάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας), υπό την προϋπόθεση ότι επιτυγχάνονται τιμές αντίστοιχης ακρίβειας. Τα υπολείμματα μετά την εξάτμιση 100 ml διαλύτη μπορούν να ελεγχθούν. Διαλύτες με υψηλότερο σημείο ζέσεως από το n-εξάνιο χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να εξατμιστούν. Ωστόσο, προτιμώνται λόγω της τοξικότητας του εξανίου.

▼ **M11**

- 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 φαιόχρον όσο παραμένει γι' αυτό πρέπει να παρασκευάζεται σε ημερήσια βάση και να φυλάσσεται σε καλώς πωματισμένες σκούρες υάλινες φιάλες.

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

Σημείωση 4.

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

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

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

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

Σημείωση 5.

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

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

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

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

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

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

Σημείωση 6.

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

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

6.1.3. Το διάλυμα εξανίου διαβιβάζεται μέσω άνδρου 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 ταπεινώση της στάθμης του διαλύματος μέχρι της ανωτάτης στάθμης του θεικού νατρίου και αρχίζει η χρωματογραφική έκλουση με εξάνιο με ταχύτητα ροής ίση προς 1 ml/min περίπου. Απορρίπτονται τα πρώτα 25-30 ml του εκλούσματος και συλλέγονται τα επόμενα 40 ml. Το κλάσμα αυτό μεταγγίζεται σε σφαιρική φιάλη των 100 ml.

Σημείωση 7.

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

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

Σημείωση 8.

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

▼ **M11****6.3. Αέριος χρωματογραφία:**

6.3.1. Συνθήκες εργασίας για διάταξη έγχυσης split:

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

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

Το σύστημα αέριας χρωματογραφίας πρέπει να ελέγχεται με έγχυση μείγματος από το μητρικό διάλυμα χολησταδινίου (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 ισομερούς 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 στιγμασταδινίων 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 εξεγενισμένου φυτικού ελαίου με τη χρησιμοποίηση μικρότερης ποσότητας δείγματος (1-2 g). Τα στιγμασταδιένια εμφανίζονται ως ευμεγέθης κορυφή που ταυτοποιείται εύκολα.

6.3.3. Ποσοτικός προσδιορισμός

Η περιεκτικότητα σε στιγμασταδιένιο προσδιορίζεται βάσει του τύπου:

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

▼ M11

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

A_c = εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (χολησταδένιο)

M_c = μάζα (σε mg) του προστιθέμενου προτύπου

M_o = μάζα (σε g) του δείγματος ελαίου.

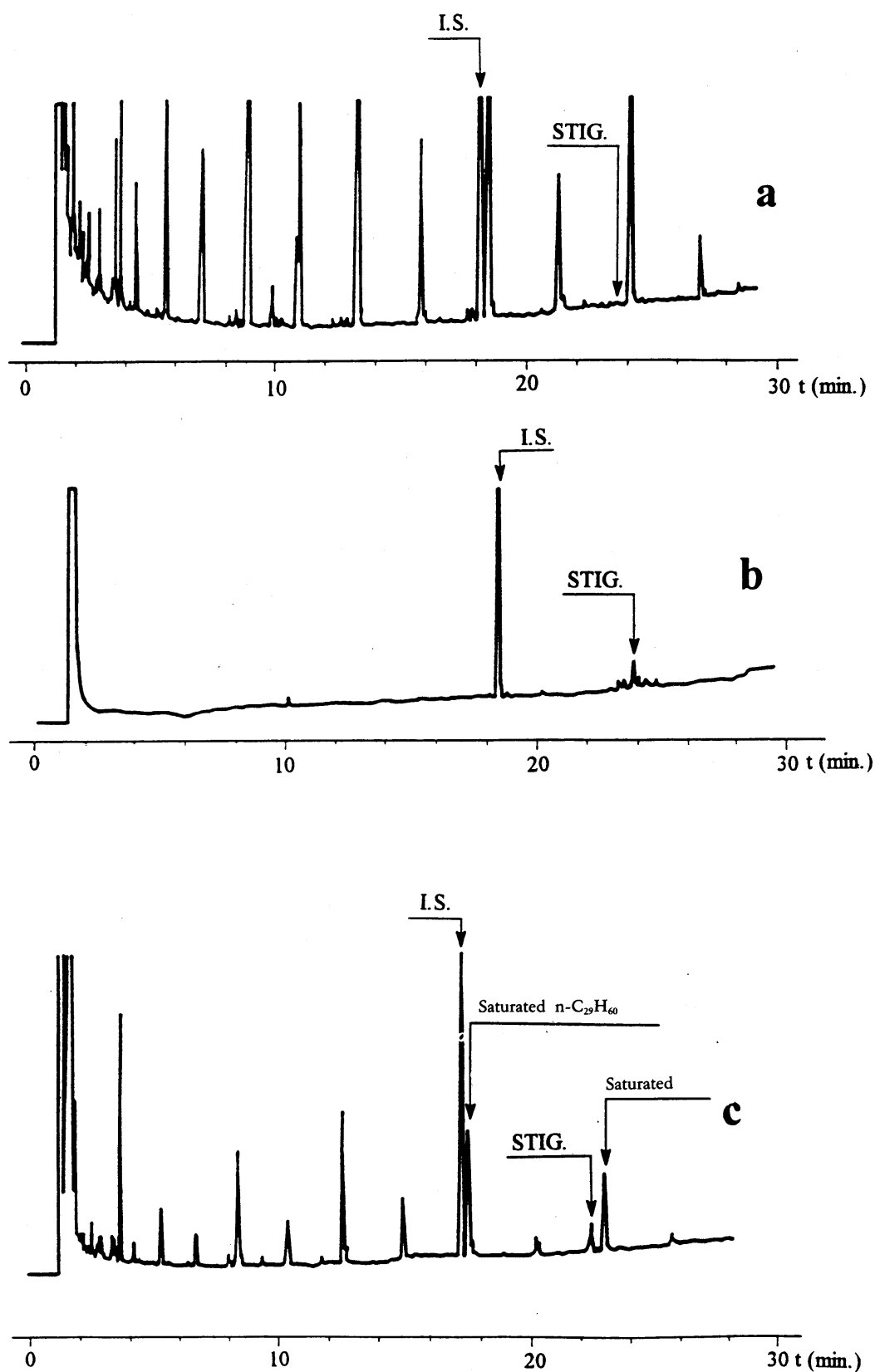
Το όριο ανίχνευσης κυμαίνεται γύρω από την τιμή 0,01 mg/kg.

▼ M32

Σημείωση 10.

Όταν τα στιγμασταδιένια εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις άνω των 4 mg/kg, εάν απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός, πρέπει να εφαρμόζεται η μέθοδος του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιοκομίας για τον προσδιορισμό των στερενίων σε εξευγενισμένο έλαιο.

▼ M11

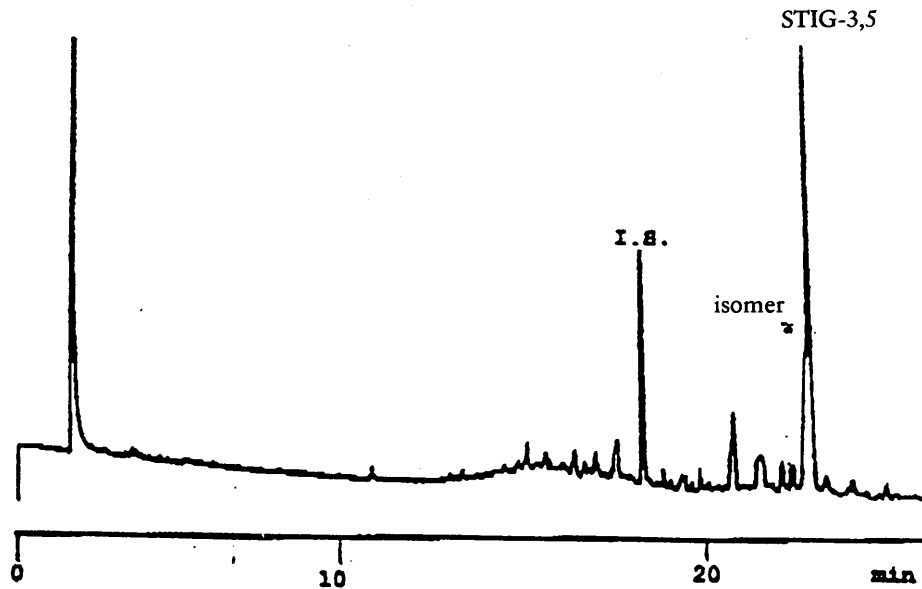


Σχήμα 1

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

▼ M11

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

**Σχήμα 2**

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

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

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

2. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

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

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

4. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

4.1. Εργαστηριακά σκεύη και όργανα

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

▼ M25

- 4.1.13. Στήλη: σωλήνας από ανοξείδωτο χάλυβα, διαστάσεων 250 mm (μήκος) x 4,5 mm (εσωτερική διάμετρος), πληρωμένος με διοξείδιο του πυριτίου που περιέχει 22 έως 23% άνθρακα σε μορφή δεκαοκτολοσιλανίου, διαμέτρου σωματιδίων 5 μm.
- 4.1.14. Λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων.
- 4.1.15. Φιαλίδια των 2 ml περίπου, με διάφραγμα (septum) επιστρωμένο με Teflon και βιδωτό πόμα.
- 4.2. **Αντιδραστήρια**

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

▼ M32

- 4.2.1. Πετρελαϊκός αιθέρας, κλάσμα 40-60 °C, χρωματογραφικής καθαρότητας, ή εξάνιο. Το εξάνιο μπορεί να αντικατασταθεί από ισοοκτάνιο (2,2,4-τριμεθυλοπεντάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας), υπό την προϋπόθεση ότι επιτυγχάνονται τιμές αντίστοιχης ακρίβειας. Διαλύτες με υψηλότερο σημείο ζέσεως από το n-εξάνιο χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να εξατμιστούν. Ωστόσο, προτιμώνται λόγω της τοξικότητας του εξανίου.

▼ M25

- 4.2.2. Αιθυλαιθέρας, χωρίς υπεροξειδία, πρόσφατα αποσταγμένος.
- 4.2.3. Διαλύτης έκλουσης για τον καθαρισμό του ελαίου με χρωματογραφία στήλης: μείγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθυλαιθέρα 87:13 (v/v).
- 4.2.4. Πυριτική πηκτή (silica gel) με κόκκους μεγέθους 70-230 mesh, τύπου Merck 7734, με τυποποιημένο ποσοστό υγρασίας 5% (w/w).
- 4.2.5. Υαλοβάμβακας.
- 4.2.6. Ακετόνη για HPLC.
- 4.2.7. Ακετονιτρίλιο ή προπιονιτρίλιο για HPLC.
- 4.2.8. Διαλύτης έκλουσης HPLC: μείγμα ακετονιτρίλιου-ακετόνης (οι αναλογίες ρυθμίζονται κατά τρόπο ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός: εκκίνηση με μείγμα 50:50) ή προπιονιτρίλιο.
- 4.2.9. Διαλύτης διαλυτοποίησης: ακετόνη
- 4.2.10. Τριγλυκερίδια αναφοράς: είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τριγλυκερίδια του εμπορίου (τριπαλμιτίνη, τριελαΐνη κ.λπ.) και στη συνέχεια να χαραχθεί καμπύλη των χρόνων κατακράτησης συναρτήσει του ισοδύναμου αριθμού ατόμων άνθρακα ή, εναλλακτικά, να χρησιμοποιηθούν χρωματογραφήματα αναφοράς που έχουν ληφθεί με σογιέλαιο, μείγμα σογιελαίου-ελαιολάδου σε αναλογία 30:70 και καθαρό ελαιόλαδο (βλέπε σημειώσεις 1 και 2 και σχήματα 1 έως 4).
- 4.2.11. Στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) των 6 ml, με 1 g διοξειδίου του πυριτίου ως στερεά φάση.

▼ M32

- 4.2.12. Επτάνιο, χρωματογραφικής καθαρότητας. Το επτάνιο μπορεί να αντικατασταθεί από ισοοκτάνιο (2,2,4-τριμεθυλοπεντάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας).

▼ M25**4.3. Προετοιμασία του δείγματος**

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

4.3.1. Ετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.3.3. *Καθαρισμός με SPE*

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

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

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

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

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

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

4.4.2. *Διαδικασία*

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

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

4.4.3. *Υπολογισμός και έκφραση των αποτελεσμάτων*

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

Η σχετική εκατοστιαία αναλογία κάθε τριγλυκεριδίου υπολογίζεται από τον τύπο:

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

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

Βλέπε σημειώσεις 1 έως 4.

▼ **M25**4.5. **Υπολογισμός της σύστασης σε τριακυλογλυκερόλες (γραμμομία %) από δεδομένα για τη σύσταση σε λιπαρά οξέα (εμβαδόν %)**

4.5.1. Προσδιορισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα

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

4.5.2. Λιπαρά οξέα για τους υπολογισμούς

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Το αποτέλεσμα παρέχει την εκατοστιαία αναλογία κάθε λιπαρού οξέος, σε γραμμομία %, αδιακρίτως θέσης (1, 2 και 3) στις TAG.

Στη συνέχεια υπολογίζεται το άθροισμα των κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) P και S και το άθροισμα των ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFA) Po, O, L και Ln (3):

$$\text{γραμμομία \% SFA} = \text{γραμμομία \% P} + \text{γραμμομία \% S}$$

$$\text{γραμμομία \% UFA} = 100 - \text{γραμμομία \% SFA}$$

▼ **M25**

4.5.5. Υπολογισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα στη θέση 2 και στις θέσεις 1 και 3 των TAG

Τα λιπαρά οξέα κατανομούνται σε τρεις ομάδες ως εξής: μια ομάδα για τη θέση 2 και δύο ίδιες μεταξύ τους ομάδες για τις θέσεις 1 και 3, με διαφορετικούς συντελεστές για τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (P και S) και τα ακόρεστα (Po, O, L και Ln).

4.5.5.1. Κορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2 [P(2) και S(2)] (4)

$$\text{γραμμομρία \% P(2)} = \text{γραμμομρία \% P (1,2,3)} * 0,06$$

$$\text{γραμμομρία \% S(2)} = \text{γραμμομρία \% S (1,2,3)} * 0,06$$

4.5.5.2. Ακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση 2 [Po(2), O(2), L(2) και Ln(2)] (5):

$$\text{γραμμομρία \% Po(2)} = \frac{\text{γραμμομρία \% Po(1,2,3)}}{\text{γραμμομρία \% UFA}} * (100 - \text{γραμμομρία \% P(2)} - \text{γραμμομρία \% S(2)})$$

$$\text{γραμμομρία \% O(2)} = \frac{\text{γραμμομρία \% O(1,2,3)}}{\text{γραμμομρία \% UFA}} * (100 - \text{γραμμομρία \% P(2)} - \text{γραμμομρία \% S(2)})$$

$$\text{γραμμομρία \% L(2)} = \frac{\text{γραμμομρία \% L(1,2,3)}}{\text{γραμμομρία \% UFA}} * (100 - \text{γραμμομρία \% P(2)} - \text{γραμμομρία \% S(2)})$$

$$\text{γραμμομρία \% Ln(2)} = \frac{\text{γραμμομρία \% Ln(1,2,3)}}{\text{γραμμομρία \% UFA}} * (100 - \text{γραμμομρία \% P(2)} - \text{γραμμομρία \% S(2)})$$

4.5.5.3. Λιπαρά οξέα στις θέσεις 1 και 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) και Ln(1,3)] (6):

$$\text{γραμμομρία \% P(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% P(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% P(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% P(1,2,3)}$$

$$\text{γραμμομρία \% S(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% S(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% S(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% S(1,2,3)}$$

$$\text{γραμμομρία \% Po(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% Po(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% Po(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% Po(1,2,3)}$$

$$\text{γραμμομρία \% O(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% O(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% O(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% O(1,2,3)}$$

$$\text{γραμμομρία \% L(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% L(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% L(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% L(1,2,3)}$$

$$\text{γραμμομρία \% Ln(1,3)} = \frac{\text{γραμμομρία \% Ln(1,2,3)} - \text{γραμμομρία \% Ln(2)}}{2} + \text{γραμμομρία \% Ln(1,2,3)}$$

4.5.6. Υπολογισμός των τριακυλογλυκερολών

4.5.6.1. TAG με ένα μόνο λιπαρό οξύ (AAA, εν προκειμένω LLL, PoPoPo) (7)

$$\text{γραμμομρία \% AAA} = \frac{\text{γραμμομρία \% A(1,3)} * \text{γραμμομρία \% A(2)} * \text{γραμμομρία \% A(1,3)}}{10\ 000}$$

4.5.6.2. TAG με δύο λιπαρά οξέα (AAB, εν προκειμένω PoPoL, PoLL) (8)

$$\text{γραμμομρία \% AAB} = \frac{\text{γραμμομρία \% A(1,3)} * \text{γραμμομρία \% A(2)} * \text{γραμμομρία \% B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{γραμμομρία \% ABA} = \frac{\text{γραμμομρία \% A(1,3)} * \text{γραμμομρία \% B(2)} * \text{γραμμομρία \% A(1,3)}}{10\ 000}$$

▼ **M25**

4.5.6.3. TAG με τρία διαφορετικά λιπαρά οξέα (ABC, εν προκειμένω OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

$$\text{γραμμομρία \% ABC} = \frac{\text{γραμμομρία \% A(1,3)} * \text{γραμμομρία \% B(2)} * \text{γραμμομρία \% C(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{γραμμομρία \% BCA} = \frac{\text{γραμμομρία \% B(1,3)} * \text{γραμμομρία \% C(2)} * \text{γραμμομρία \% A(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{γραμμομρία \% CAB} = \frac{\text{γραμμομρία \% C(1,3)} * \text{γραμμομρία \% A(2)} * \text{γραμμομρία \% B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

4.5.6.4. Τριακυλογλυκερόλες με ECN42

Οι τριακυλογλυκερόλες με ECN42 υπολογίζονται από τις εξισώσεις 7, 8 και 9 και στη συνέχεια αναφέρονται κατά τη σειρά της αναμενόμενης έκλυσης στην HPLC (κατά κανόνα, μόνο τρεις κορυφές).

LLL

PoLL και το ισομερές θέσης LPoL

OLLn και τα ισομερή θέσης OLnL και LnOL

PoPoL και το ισομερές θέσης PoLPo

PoOLn και τα ισομερή θέσης OPoLn και OLnPo

PLLn και τα ισομερή θέσης LLnP και LnPL

PoPoPo

SLnLn και το ισομερές θέσης LnSLn

PPoLn και τα ισομερή θέσης PLnPo και PoPLn

Οι τριακυλογλυκερόλες με ECN42 προκύπτουν ως το άθροισμα των εννέα τριακυλογλυκερολών, συμπεριλαμβανομένων των ισομερών θέσης. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να εκφράζονται με δύο τουλάχιστον δεκαδικά ψηφία.

5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η υπολογιζόμενη θεωρητική περιεκτικότητα συγκρίνεται με την περιεκτικότητα που προσδιορίζεται με ανάλυση HPLC. Εάν η διαφορά μεταξύ των απολύτων τιμών των δεδομένων που έχουν προκύψει από την HPLC και των θεωρητικών δεδομένων υπερβαίνει τις τιμές που προβλέπονται στο πρότυπο, για την αντίστοιχη κατηγορία ελαιολάδου, το δείγμα περιέχει σπορέλαιο.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με δύο δεκαδικά ψηφία.

6. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ (ΟΙ ΑΡΙΘΜΟΙ ΠΑΡΑΠΕΜΠΟΥΝ ΣΕ ΕΝΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ)

— 4.5.1. *Υπολογισμός των % γραμμομορίων λιπαρών οξέων από δεδομένα χρωματογραφίας αερίου-υγρού (κανονικοποιημένο εμβαδόν %)*

Ελήφθησαν τα ακόλουθα δεδομένα για τη σύσταση σε λιπαρά οξέα, με χρωματογραφία υγρού-αερίου

Λιπαρό οξύ	P	S	Po	O	L	Ln
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Εμβαδόν %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

- 4.5.3 *Μετατροπή του εμβαδού % σε γραμμομόρια για όλα τα λιπαρά οξέα [βλέπε τύπο (1)]*

$$\text{γραμμομόρια P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ γραμμομόρια P}$$

$$\text{γραμμομόρια S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ γραμμομόρια S}$$

$$\text{γραμμομόρια Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ γραμμομόρια Po}$$

$$\text{γραμμομόρια O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ γραμμομόρια O}$$

$$\text{γραμμομόρια L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ γραμμομόρια L}$$

$$\text{γραμμομόρια Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ γραμμομόρια Ln}$$

$$\text{Σύνολο} = 0,35821 \text{ γραμμομόρια TAG}$$

- 4.5.4 *Κανονικοποίηση των γραμμομορίων λιπαρών οξέων στο 100% [βλέπε τύπο (2)]*

$$\text{γραμμομόρια \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ γραμμομόρια P} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 10,887 \%$$

$$\text{γραμμομόρια \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ γραμμομόρια S} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 2,942 \%$$

$$\text{γραμμομόρια \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ γραμμομόρια Po} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 1,097 \%$$

$$\text{γραμμομόρια \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ γραμμομόρια O} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 74,116 \%$$

$$\text{γραμμομόρια \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ γραμμομόρια L} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 9,955 \%$$

$$\text{γραμμομόρια \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ γραμμομόρια Ln} * 100}{0,35821 \text{ γραμμομόρια}} = 1,002 \%$$

$$\text{Σύνολο γραμμομορίων \%} = 100\%$$

Άθροισμα των κορεσμένων και άθροισμα των ακόρεστων λιπαρών οξέων στις θέσεις 1,2 και 3 των TAG [βλέπε τύπο (3)]

$$\text{γραμμομόρια \% SFA} = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% UFA} = 100,000 \% - 13,829 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

- 4.5.5 *Υπολογισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα στη θέση 2 και στις θέσεις 1 και 3 των TAG*

- 4.5.5.1 *Κορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2 [P(2) and S(2)] [βλέπε τύπο (4)]*

$$\text{γραμμομόρια \% P(2)} = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% S(2)} = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \text{ γραμμομόρια \%}$$

- 4.5.5.2 *Ακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση 2 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) και Ln(1,3)] [βλέπε τύπο (5)]*

$$\text{γραμμομόρια \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% O(2)} = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% L(2)} = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% Ln(2)} = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \text{ γραμμομόρια \%}$$

▼ **M25**

- 4.5.5.3 Λιπαρά οξέα στις θέσεις 1 και 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) και Ln(1,3)] [βλέπε τύπο (6)]

$$\text{γραμμομόρια \% P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% L(1,3)} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \text{ γραμμομόρια \%}$$

$$\text{γραμμομόρια \% Ln(1,3)} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \text{ γραμμομόρια \%}$$

- 4.5.6. Υπολογισμός των τριακυλογλυκερολών

Από την υπολογισθείσα σύσταση σε λιπαρά οξέα στις θέσεις στερεοειδικής αρίθμησης 1 και 3

Λιπαρό οξύ	στις θέσεις 1 και 3	στη θέση 2
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Άθροισμα	100,0 %	100,0 %

υπολογίζονται οι ακόλουθες τριακυλογλυκερόλες:

LLL

PoPoPo

PoLL με 1 ισομερές θέσης

SLnLn με 1 ισομερές θέσης

PoPoL με 1 ισομερές θέσης

PPoLn με 2 ισομερή θέσης

OLLn με 2 ισομερή θέσης

PLLn με 2 ισομερή θέσης

PoOLn με 2 ισομερή θέσης

- 4.5.6.1. TAG με ένα μόνο λιπαρό οξύ (LLL, PoPoPo) [βλέπε τύπο (7)]

$$\text{mol \% LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,09706 \text{ mol LLL}}$$

$$\text{mol \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,00013 \text{ mol PoPoPo}}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2 TAG με δύο λιπαρά οξέα (PoLL, SLnLn, PoPoL) [βλέπε τύπο (8)]

$$\text{mol \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,02141$$

$$\text{mol \% LPoL} = \frac{9,204 \% * 1,262 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = 0,01069$$

0,03210 mol PoLL

$$\text{mol \% SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,325 \% * 1,153 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00092$$

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

0,00094 mol SLnLn

$$\text{mol \% PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00236$$

$$\text{mol \% PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

— 4.5.6.3 TAG με τρία διαφορετικά λιπαρά οξέα (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) [βλέπε τύπο (9)]

$$\text{mol \% PPLn} = \frac{16,004 \% * 1,262 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00374$$

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

$$\text{mol \% PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,00375$$

0,00761 mol PPLn

$$\text{mol \% OLLn} = \frac{68,526 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,14556$$

$$\text{mol \% LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,296 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,14555$$

$$\text{mol \% LLnO} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,14544$$

0,43655 mol OLLn

$$\text{mol \% PLLn} = \frac{16,004 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,03399$$

$$\text{mol \% LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00111$$

$$\text{mol \% LLnP} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,03397$$

0,06907 mol PLLn

▼ M25

$$\text{mol \% PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,296 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,01605$$

$$\text{mol \% LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,262 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,01603$$

$$\text{mol \% OLnPo} = \frac{68,526 \% * 1,153 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,01604$$

0,04812 mol PoOLn
ECN42 = 0,69512 mol TAG

Σημείωση 1: Η σειρά έκλουσης μπορεί να προσδιοριστεί με υπολογισμό των ισοδύναμων αριθμών ατόμων άνθρακα, οι οποίοι συχνά ορίζονται από τη σχέση $ECN = CN - 2n$, όπου CN είναι ο αριθμός ατόμων άνθρακα και n ο αριθμός διπλών δεσμών. Η εν λόγω σειρά μπορεί να υπολογιστεί ακριβέστερα αν ληφθεί υπόψη η προέλευση των διπλών δεσμών. Αν n_o , n_i και n_{in} είναι οι αριθμοί των διπλών δεσμών του ελαϊκού, του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος, αντίστοιχα, ο ισοδύναμος αριθμός ατόμων άνθρακα μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση που παριστά ο ακόλουθος τύπος:

$$EN = CN - d_o n_o - d_i n_i - d_{in} n_{in}$$

όπου οι συντελεστές d_o , d_i και d_{in} υπολογίζονται από τα τριγλυκερίδια αναφοράς. Στις συνθήκες που καθορίζονται στην παρούσα μέθοδο, η σχέση που προκύπτει είναι κατά προσέγγιση:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_i) - (2,17 n_{in})$$

Σημείωση 2: Για αρκετά τριγλυκερίδια αναφοράς είναι επίσης δυνατόν να υπολογιστεί η διαχωριστική ικανότητα ως προς την τριελαϊνή

$$\alpha = RT^1 / RT \text{ τριελαϊνης}$$

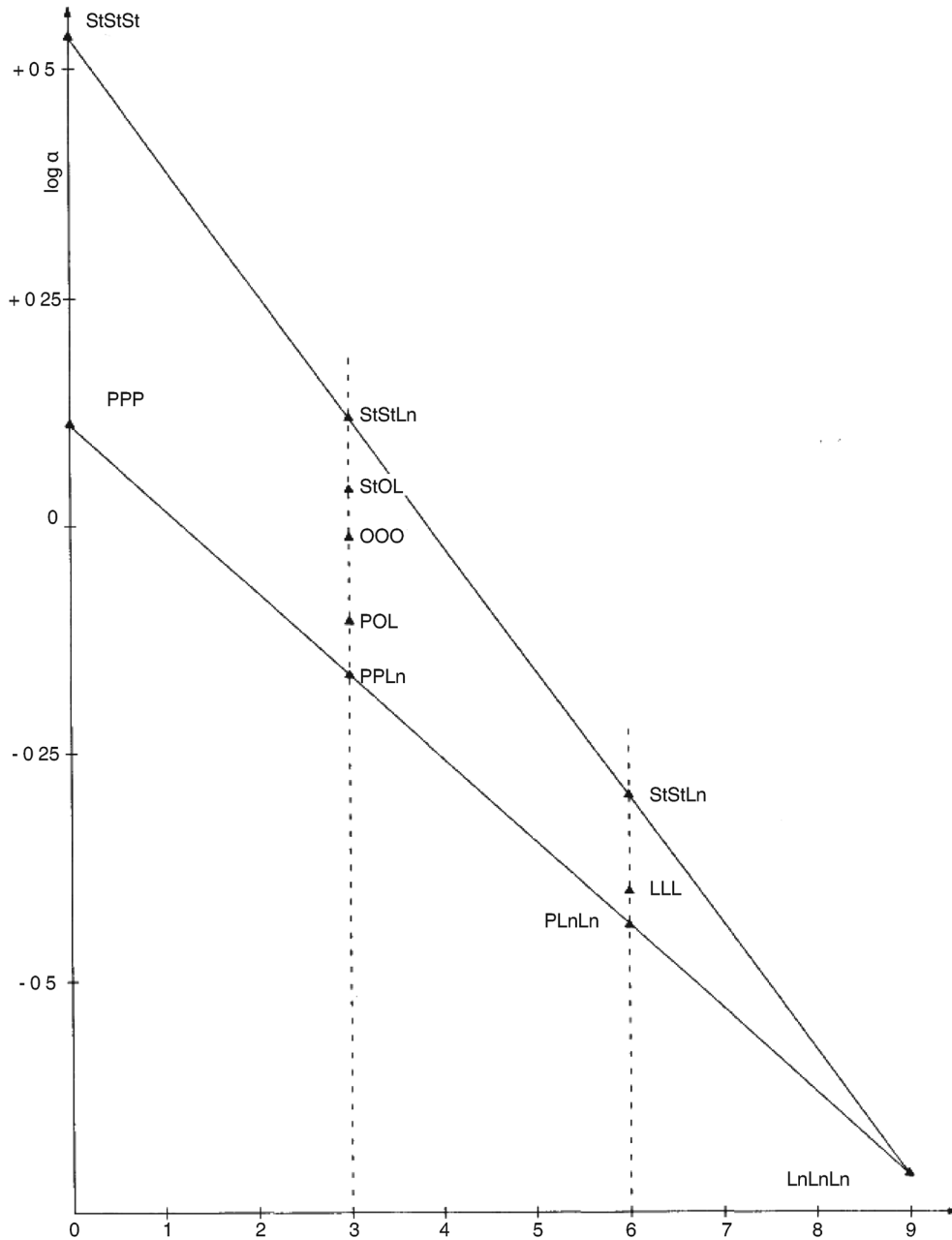
με τη χρήση του ανηγμένου χρόνου κατακράτησης $RT^1 = RT - RT$ διαλύτη. Η γραφική παράσταση του λογάριθμου $\log \alpha$ συναρτήσει του αριθμού των διπλών δεσμών επιτρέπει τον προσδιορισμό των τιμών χρόνου κατακράτησης για όλα τα τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων που περιέχουν τα τριγλυκερίδια αναφοράς – βλέπε σχήμα 1.

Σημείωση 3: Η αποδοτικότητα της στήλης θα πρέπει να επιτρέπει τον πλήρη διαχωρισμό της κορυφής που αντιστοιχεί στην τριλιελαϊνή από τις κορυφές που αντιστοιχούν στα τριγλυκερίδια με γειτονικούς χρόνους κατακράτησης. Η έκλουση εκτελείται μέχρι την κορυφή που αντιστοιχεί στον ECN 52.

Σημείωση 4: Εξασφαλίζεται ορθή μέτρηση του εμβαδού όλων των κορυφών που ενδιαφέρουν στο πλαίσιο του παρόντος προσδιορισμού, αν η δεύτερη κορυφή που αντιστοιχεί στον ECN 50 καλύπτει το 50% της πλήρους κλίμακας του καταγραφέα.

▼ M25

Σχήμα 1

Γραφική παράσταση του λογάριθμου $\log a$ συναρτήσει του αριθμού των διπλών δεσμών

Αριθμός διπλών δεσμών

La: λαυρικό οξύ, My: μυριστικό οξύ, P: παλμιτικό οξύ, S: στεατικό οξύ, O: ελαϊκό οξύ,

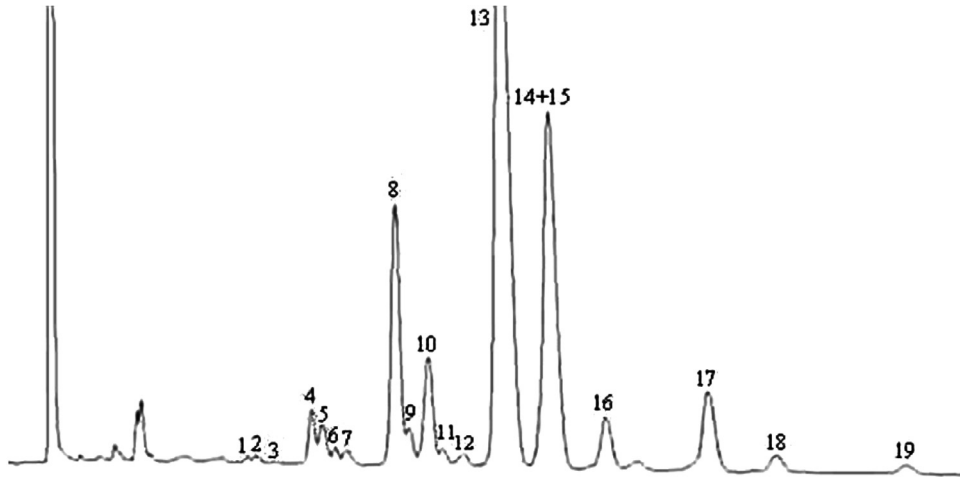
L: λιγνελικό οξύ, Ln: λινολενικό οξύ

▼ **M25**

Σχήμα 2

Ελαιόλαδο χαμηλής περιεκτικότητας σε λινελαϊκό οξύ

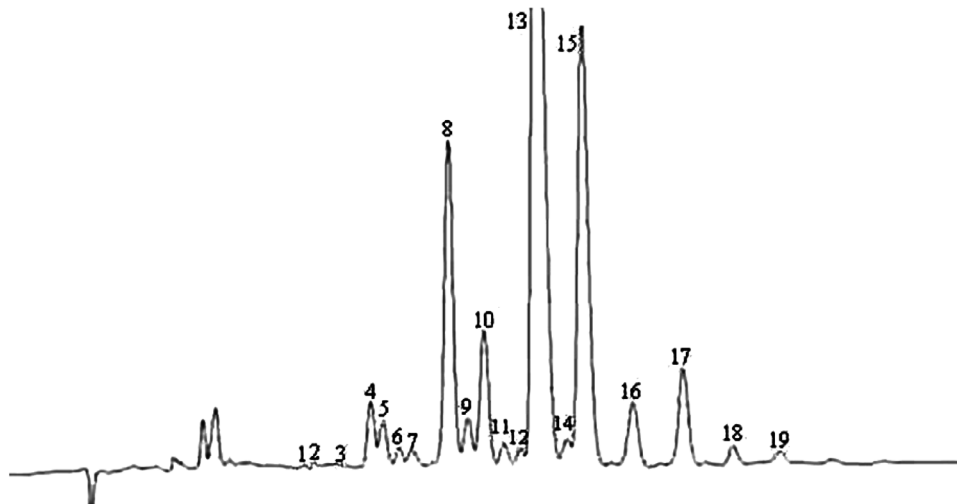
α)



Με διαλύτη: μείγμα ακετόνης-ακετονιτριλίου

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ α: Κύρια συστατικά των χρωματογραφικών κορυφών: **ECN42:** (1) LLL + PoLL, (2) OLLn + PoOLn, (3) PLLn· **ECN44:** (4) OLL + PoOL, (5) OOLn + PLL, (6) POLn + PPOPo, (7) OOL + PoOO· **ECN46:** (8) OOL + LnPP, (9) PoOO, (10) SLL + PLO, (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo, (12) PLP· **ECN48:** (13) OOO + PoPP, (14 + 15) SOL + POO, (16) POP· **ECN50:** (17) SOO, (18) POS + SLS.

β)



Με διαλύτη: προπιονιτρίλιο

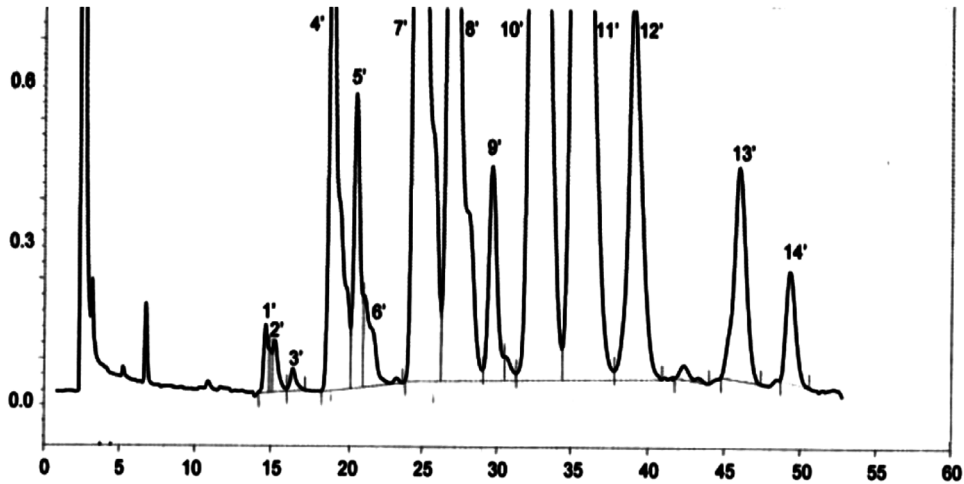
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ β: Κύρια συστατικά των χρωματογραφικών κορυφών: **ECN42:** (1) LLL, (2) OLLn + PoLL, (3) PLLn· **ECN44:** (4) OLL, (5) OOLn + PoOL, (6) PLL + PoPoO, (7) POLn + PPOPo + PPOl· **ECN46:** (8) OOL + LnPP, (9) PoOO, (10) SLL + PLO, (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo, (12) PLP· **ECN48:** (13) OOO + PoPP, (14) SOL, (15) POO, (16) POP· **ECN50:** (17) SOO, (18) POS + SLS

▼ M25

Σχήμα 3

Ελαιόλαδο υψηλής περιεκτικότητας σε λινελαϊκό οξύ

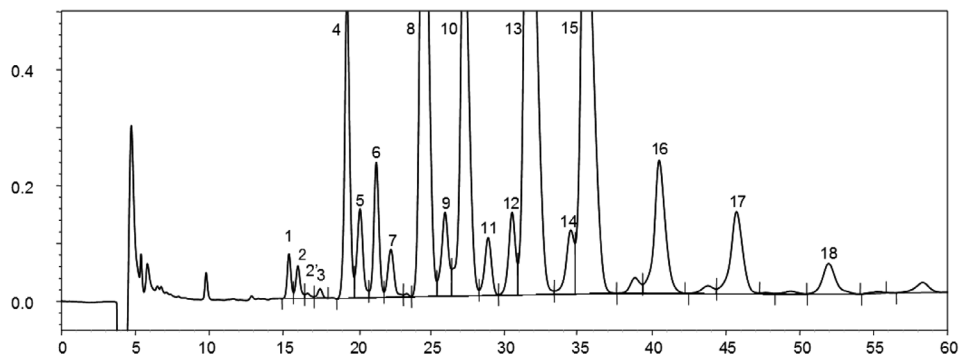
α)



Με διαλύτη: μείγμα ακετόνης-ακετονιτριλίου (50:50)

Διάγραμμα α: Κύρια συστατικά των χρωματογραφικών κορυφών: **ECN42**: (1') LLL + PoLL, (2') OLLn + PoOLn, (3') PLLn· **ECN44**: (4') OLL + PoOL, (5') OOLn + PLL, (6') POLn + PPOPo· **ECN46**: (7') OOL + PoOO, (8') PLO + SLL + PoOP, (9') PLP + PoPP· **ECN48**: (10') OOO, (11') POO + SLL + PPO, (12') POP + PLS· **ECN50**: (13') SOO, (14') POS + SLS

β)



Με διαλύτη: προπιονιτρίλιο

Διάγραμμα β: Κύρια συστατικά των χρωματογραφικών κορυφών: **ECN42**: (1) LLL, (2 + 2') OLLn + PoLL, (3) PLLn· **ECN44**: (4) OLL, (5) OOLn + PoOL, (6) PLL + PoPoO, (7) POLn + PPOPo + PPOl· **ECN46**: (8) OOL + LnPP, (9) PoOO, (10) SLL + PLO, (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo· **ECN48**: (12) PLP, (13) OOO + PoPP, (14) SOL, (15) POO, (16) POP· **ECN50**: (17) SOO, (18) POS + SLS· **ECN52**: (19) AOO.

▼ **M32***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIX***ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΣΕ ΣΤΕΡΟΛΕΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ
ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΡΙΧΟΕΙΛΟΥΣ ΣΤΗΛΗΣ****1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Η μέθοδος περιγράφει τη διαδικασία προσδιορισμού της περιεκτικότητας ελαιολάδων και πυρηνελαίων καθώς και μειγμάτων αυτών των δύο ελαίων σε αλκοολούχες ενώσεις, μεμονωμένες και ολικές.

Στις αλκοολούχες ενώσεις των ελαιολάδων και πυρηνελαίων περιλαμβάνονται αλειφατικές αλκοόλες, στερόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα έλαια, στα οποία έχουν προστεθεί α-χολεστανόλη και 1-εικοσανόλη ως εσωτερικά πρότυπα, σαπωνοποιούνται με αιθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου και, στη συνέχεια, οι ασαπωνοποίητες ύλες εκχυλίζονται με αιθυλαιθέρα.

Τα κλάσματα των διαφόρων αλκοολούχων ενώσεων διαχωρίζονται από τις ασαπωνοποίητες ύλες είτε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε βασική πλάκα διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) (μέθοδος αναφοράς) είτε με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε στήλη διοξειδίου του πυριτίου. Τα κλάσματα που ανακτώνται από τον διαχωρισμό σε πλάκα διοξειδίου του πυριτίου μετατρέπονται σε τριμεθυλοσιλυλαιθέρους και, στη συνέχεια, υποβάλλονται σε ανάλυση με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης.

ΜΕΡΟΣ 1**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΑΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΤΩΝ ΥΛΩΝ****1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Στο παρόν μέρος περιγράφεται η παρασκευή και η εκχύλιση των ασαπωνοποίητων υλών. Περιλαμβάνεται η παρασκευή και η εκχύλιση των ασαπωνοποίητων υλών από ελαιόλαδα και πυρηνέλαια.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μια ποσότητα δοκιμής σαπωνοποιείται μέσω βρασμού σε κάθετο ψυκτήρα με αιθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου. Οι ασαπωνοποίητες ύλες εκχυλίζονται με διαιθυλαιθέρα.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα εξής:

- 3.1. Σφαιρική φιάλη των 250 ml, εφοδιασμένη με κάθετο ψυκτήρα με εσφυρισμένους κωνικούς συνδέσμους.
- 3.2. Διαχωριστική χοάνη των 500 ml.
- 3.3. Σφαιρικές φιάλες των 250 ml.
- 3.4. Μικροσύριγγες των 100μl και των 500 μl.
- 3.5. Κυλινδρική διηθητική χοάνη με πορώδες διάφραγμα G3 (πορώδους 15-40 μm), διαμέτρου 2 cm περίπου και ύψους 5 cm, κατάλληλη για διήθηση υπό κενό, και με εσφυρισμένο κωνικό σύνδεσμο (αρσενικό).
- 3.6. Κωνική φιάλη των 50 ml, με εσφυρισμένο κωνικό σύνδεσμο (θηλυκό), η οποία μπορεί να συνδεθεί με τη διηθητική χοάνη (3.5).
- 3.7. Δοκιμαστικός σωλήνας των 10 ml με κωνικό πυθμένα και με γυάλινο πόμα ασφαλείας.
- 3.8. Ξηραντήρας με χλωριούχο ασβέστιο.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 4.1. Υδροξείδιο του καλίου τίτλου τουλάχιστον 85 %.

▼ **M32**

- 4.2. Αιθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου, περίπου 2 M.

Διαλύονται υπό ψύξη 130 g υδροξειδίου του καλίου (4.1) σε 200 ml αποσταγμένου νερού και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το ένα λίτρο με αιθανόλη (4.7). Το διάλυμα φυλάσσεται σε καλά πωματισμένες σκοτεινόχρωμες γυάλινες φιάλες, για 2 ημέρες κατά μέγιστο όριο.

- 4.3. Αιθυλαιθέρας, αναλυτικής καθαρότητας.
- 4.4. Άνυδρο θειικό νάτριο, αναλυτικής καθαρότητας.
- 4.5. Ακετόνη, χρωματογραφικής καθαρότητας.
- 4.6. Αιθυλαιθέρας, χρωματογραφικής καθαρότητας.
- 4.7. Αιθανόλη, αναλυτικής καθαρότητας.
- 4.8. Οξικός αιθυλεστέρας, αναλυτικής καθαρότητας.
- 4.9. Εσωτερικό πρότυπο, α-χολεστανόλη, καθαρότητας άνω του 99 % (η καθαρότητα πρέπει να ελέγχεται με αεριοχρωματογραφική ανάλυση).
- 4.10. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου α-χολεστανόλης 0,2 % (m/V) σε οξικό αιθυλεστέρα (4.8).
- 4.11. Διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης 10 g/L σε αιθανόλη (4.7).
- 4.12. Διάλυμα 1-εικοσανόλης 0,1 % (m/v) σε οξικό αιθυλεστέρα (εσωτερικό πρότυπο).

5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Με τη βοήθεια μικροσύριγγας των 500 μl (3.4), εισάγεται στη σφαιρική φιάλη των 250 ml (3.1) όγκος διαλύματος εσωτερικού προτύπου α-χολεστανόλης (4.10) και όγκος 1-εικοσανόλης (4.12) που περιέχουν ποσότητα χολεστανόλης και εικοσανόλης η οποία αντιστοιχεί σε 10 % περίπου της περιεκτικότητας του δείγματος σε στερόλες και αλκοόλες. Για παράδειγμα, για 5 g δείγματος ελαιολάδου πρέπει να προστεθούν 500 μl του διαλύματος α-χολεστανόλης (4.10) και 250 μl του διαλύματος 1-εικοσανόλης (4.12). Για πυρηνέλαια προστίθενται 1500 μL αμφοτέρων των διαλυμάτων α-χολεστανόλης (4.10) και 1-εικοσανόλης (4.12). Το διάλυμα εξατμίζεται σε θερμό υδατόλουτρο, με ελαφρύ ρεύμα αζώτου, μέχρι ξηρού. Μετά την ψύξη της σφαιρικής φιάλης ζυγίζονται $5,00 \pm 0,01$ g ξηρού διηθημένου δείγματος στην ίδια σφαιρική φιάλη.

Σημείωση 1: Στην περίπτωση των ζωικών ή φυτικών λιπών και ελαίων τα οποία περιέχουν σημαντικές ποσότητες χοληστερόλης, μπορεί να εμφανιστεί κορυφή η οποία έχει τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με αυτόν της χολεστανόλης. Σε αυτή την περίπτωση, πρέπει να αναλύεται το στερολικό κλάσμα εις διπλούν, με και χωρίς εσωτερικό πρότυπο.

Προστίθενται 50 ml αιθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου 2M (4.2) και τεμαχίδια ελαφρόπετρας, συνδέεται ο κάθετος ψυκτήρας και το σύνολο θερμαίνεται, διατηρούμενο σε ήπιο βρασμό, μέχρι να πραγματοποιηθεί η σαπωνοποίηση (το διάλυμα γίνεται διαυγές). Συνεχίζεται η θέρμανση για 20 ακόμη λεπτά, έπειτα προστίθενται 50 ml αποσταγμένου νερού από το επάνω μέρος του ψυκτήρα, αποσυνδέεται ο ψυκτήρας και ψύχεται η σφαιρική φιάλη μέχρι τους 30 °C περίπου.

Μεταγγίζεται ποσοτικώς το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης σε διαχωριστική χοάνη των 500 ml (3.2), με τη βοήθεια διαδοχικών ποσοτήτων αποσταγμένου νερού (50 ml). Προστίθενται περίπου 80 ml αιθυλαιθέρα (4.6) και ανακινείται ζωηρά η διαχωριστική χοάνη για περίπου 60 δευτερόλεπτα, ενώ κατά διαστήματα εκτονώνεται η πίεση με αναστροφή της χοάνης και άνοιγμα της στρόφιγγας. Αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των δύο φάσεων (σημείωση 2). Στη συνέχεια, αφαιρείται όσο το δυνατόν πληρέστερα το διάλυμα σάπωνα και φέρεται σε δεύτερη διαχωριστική χοάνη. Εκτελούνται δύο ακόμη εκχυλίσεις της υδατικής-αλκοολικής φάσης με τον ίδιο τρόπο και με 60 έως 70 ml αιθυλαιθέρα (4.6).

Σημείωση 2: Τα πιθανά γαλακτώματα μπορούν να καταστραφούν με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων αιθανόλης (4.7).

▼ **M32**

Ενώνονται τα τρία αιθερικά εκχυλίσματα σε μία διαχωριστική χοάνη, η οποία περιέχει 50 ml νερού. Συνεχίζεται η έκπλυση με νερό (50 ml) μέχρις ότου το νερό έκπλυσης δεν χρωματίζεται πλέον ρόδινο με την προσθήκη μιας σταγόνας διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης (4.11). Μετά την απομάκρυνση του νερού έκπλυσης, ακολουθεί διήθηση σε άνυδρο θειικό νάτριο (4.4) σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη των 250 ml, ενώ η χοάνη και ο ηθμός εκπλύνονται με μικρές ποσότητες αιθυλαιθέρα (4.6).

Εξατμίζεται ο διαλύτης με απόσταξη σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 30 °C υπό κενό. Προστίθενται 5 ml ακετόνης (4.5) και απομακρύνεται πλήρως ο πτητικός διαλύτης με ελαφρύ ρεύμα αζώτου. Το υπόλειμμα ξηραίνεται σε κλίβανο στους 103 ± 2 °C επί 15 λεπτά. Ψύχεται σε ξηραντήρες και ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg.

ΜΕΡΟΣ 2**ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ****1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Οι ασαπωνοποίητες ύλες που παρασκευάζονται στο μέρος 1 διαχωρίζονται με κλασμάτωση στις διάφορες αλκοολούχες ενώσεις, αλειφατικές αλκοόλες, στερόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες (ερυθροδιόλη και ουβαόλη).

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Οι ασαπωνοποίητες ύλες μπορούν να υποστούν κλασματικό διαχωρισμό με τη χρήση βασικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (μέθοδος αναφοράς), να αποκαλυφθούν, και οι αντίστοιχες ζώνες να αφαιρεθούν και να εκχυλιστούν. Ως εναλλακτική μέθοδος διαχωρισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με στήλη διοξειδίου του πυριτίου και ανιχνευτή υπεριώδους για τη συλλογή των διαφορετικών κλασμάτων. Οι αλειφατικές και τριτερπενικές αλκοόλες καθώς και οι στερόλες και οι τριτερπενικές διαλκοόλες απομονώνονται μαζί.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα εξής:

- 3.1. Πλήρης εξοπλισμός για ανάλυση με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20 × 20 cm.
- 3.2. Λυχνία υπεριώδους φωτός, με μήκος κύματος 366 ή 254 nm.
- 3.3. Μικροσύριγγες των 100μl και των 500 μl.
- 3.4. Κυλινδρική διηθητική χοάνη με πορώδες διάφραγμα G3 (πορώδους 15-40 μm), διαμέτρου 2 cm περίπου και ύψους 5 cm, κατάλληλη για διήθηση υπό κενό, και με εσμηρισμένο κωνικό σύνδεσμο (αρσενικό).
- 3.5. Κωνική φιάλη των 50 ml, με εσμηρισμένο κωνικό σύνδεσμο (θηλυκό), η οποία μπορεί να συνδεθεί με τη διηθητική χοάνη (3.4).
- 3.6. Δοκιμαστικός σωλήνας των 10 ml με κωνικό πυθμένα και με γυάλινο πώμα ασφαλείας.
- 3.7. Ξηραντήρας με χλωριούχο ασβέστιο.
- 3.8. Σύστημα HPLC που αποτελείται από:
 - 3.8.1. Δυναδική αντλία.
 - 3.8.2. Χειροκίνητο ή αυτόματο σύστημα έγχυσης εφοδιασμένο με βρόχο έγχυσης 200 μL.
 - 3.8.3. Απαεριωτής εν σειρά.
 - 3.8.4. Ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους (UV/VIS) ή υπερύθρου (IR).
- 3.9. Στήλη HPLC (25 cm x 4 mm εσωτερική διάμετρος) με διοξείδιο του πυριτίου 60 (μέγεθος σωματιδίων 5 μm).
- 3.10. Φίλτρο σύριγγας 0,45 μm.
- 3.11. Κωνικές φιάλες 25 mL.

▼ **M32**

4. ANΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

4.1. Υδροξείδιο του καλίου τίτλου τουλάχιστον 85 %.

4.2. Αιθανολικό διάλυμα υδροξείδιου του καλίου, περίπου 2 M.

Διαλύονται υπό ψύξη 130 g υδροξείδιου του καλίου (4.1) σε 200 ml αποσταγμένου νερού και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το ένα λίτρο με αιθανόλη (4.9). Το διάλυμα φυλάσσεται σε καλά πωματισμένες σκοτεινόχρωμες γυάλινες φιάλες, για 2 ημέρες κατά μέγιστο όριο.

4.3. Αιθυλαιθέρας, αναλυτικής καθαρότητας.

4.4. Αιθανολικό διάλυμα υδροξείδιου του καλίου, περίπου 0,2 M.

Διαλύονται 13 g υδροξείδιου του καλίου (4.1) σε 20 ml αποσταγμένου νερού και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι το ένα λίτρο με αιθανόλη (4.9).

4.5. Γυάλινες πλάκες 20x20 επιστρωμένες με διοξείδιο του πυριτίου, χωρίς δείκτη φθορισμού, πάχους 0,25 mm (διατίθενται στο εμπόριο έτοιμες για χρήση).

4.6. Ακετόνη, χρωματογραφικής καθαρότητας.

4.7. n-εξάνιο, χρωματογραφικής καθαρότητας.

4.8. Αιθυλαιθέρας, χρωματογραφικής καθαρότητας.

4.9. Αιθανόλη, αναλυτικής καθαρότητας.

4.10. Οξικός αιθυλεστέρας, αναλυτικής καθαρότητας.

4.11. Διάλυμα αναφοράς για χρωματογραφία λεπτής στιβάδας: χοληστερόλη, φυτοστερόλες, αλκοόλες και διάλυμα ερυθροδιόλης 5 % σε οξικό αιθυλεστέρα (4.10).

4.12. Διάλυμα 2,7-διγλωροφλουορεσκεΐνης 0,2 % σε αιθανολικό διάλυμα. Το διάλυμα καθίσταται ελαφρώς αλκαλικό με την προσθήκη μερικών σταγόνων αλκοολικού διαλύματος υδροξείδιου του καλίου 2 M (4.2).

4.13. Μείγμα n-εξανίου (4.7)/αιθυλαιθέρα (4.8) 65:35 (V/V).

4.14. Κινητή φάση HPLC n-εξανίου (4.7)/αιθυλαιθέρα (4.8) 1:1 (V/V).

5. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ: ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΒΑΣΙΚΗ ΠΛΑΚΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC)

Ετοιμασία των βασικών πλακών χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Οι πλάκες διοξειδίου του πυριτίου (4.5) βυθίζονται ή εμβαπτίζονται σε βάθος περίπου 4 cm στο αιθανολικό διάλυμα υδροξείδιου του καλίου 0,2 M (4.4) επί 10 δευτερόλεπτα, στη συνέχεια αφήνονται να στεγνώσουν σε απαγωγό επί δύο ώρες και, τέλος, τοποθετούνται σε κλίβανο στους 100 °C επί μία ώρα.

Απομακρύνονται από τον κλίβανο και φυλάσσονται σε ξηραντήρα με χλωριούχο ασβέστιο (3.7) μέχρι να χρησιμοποιηθούν (οι πλάκες που έχουν υποστεί αυτή την κατεργασία πρέπει να χρησιμοποιούνται εντός 15 ημερών).

Στον θάλαμο ανάπτυξης εισάγεται μείγμα εξανίου/αιθυλαιθέρα (4.13) (σημείωση 3) σε βάθος περίπου 1 cm. Ο θάλαμος κλείνεται με κατάλληλο κάλυμμα και αφήνεται σε ηρεμία επί μισή ώρα τουλάχιστον, σε ψυχρό χώρο, ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία υγρού-ατμών. Στις εσωτερικές επιφάνειες του θαλάμου είναι δυνατόν να στερεωθούν λωρίδες διηθητικού χαρτιού που βυθίζονται στο υγρό έκλουσης. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται κατά το ένα τρίτο περίπου ο χρόνος ανάπτυξης του χρωματογραφήματος και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφη και ομαλή έκλουση των συστατικών.

Σημείωση 3: Για να επιτυγχάνονται απολύτως αναπαραγώγιμες συνθήκες έκλουσης, πρέπει να χρησιμοποιείται νέο μείγμα ανάπτυξης σε κάθε δοκιμή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικός διαλύτης μείγμα n-εξανίου-αιθυλαιθέρα 50:50 (V/V).

Παρασκευάζεται διάλυμα περίπου 5 % ασαπωνοποιητών υλών του μέρους 1 σε οξικό αιθυλεστέρα (4.10). Με μικροσύριγγες των 100 μL (3.3) τοποθετούνται στο κάτω χείλος (2 cm) της χρωματογραφικής πλάκας (4.5) 0,3 ml του διαλύματος σε λεπτή και ομοιόμορφη γραμμή. Στην ευθεία της γραμμής τοποθέτησης, φέρονται 2 έως 3 μl του διαλύματος αναφοράς των υλών (4.11) για την ταυτοποίηση της ζώνης των στερολών, των τριτερπενικών διαλκοολών και των αλκοολών μετά την ανάπτυξη.

▼ **M32**

Η πλάκα τοποθετείται στον θάλαμο ανάπτυξης (3.1). Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος πρέπει να διατηρείται μεταξύ 15 και 20 °C (σημείωση 4). Ο θάλαμος κλείνεται αμέσως με το κάλυμμα και αφήνεται προς έκλυση μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει σε ύψος περίπου 1 cm από το πάνω χείλος της πλάκας. Απομακρύνεται η πλάκα από τον θάλαμο ανάπτυξης και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα θερμού αέρα ή αφήνοντας την πλάκα να στεγνώσει σε απαγωγό.

Σημείωση 4: Τυχόν υψηλότερη θερμοκρασία θα μπορούσε να δυσχεράνει τον διαχωρισμό.

Η πλάκα ψεκάζεται ελαφρά και ομοιόμορφα με το διάλυμα 2,7-διχλωροφλουορεσκεΐνης (4.12) και, στη συνέχεια, αφήνεται να στεγνώσει. Όταν η πλάκα παρατηρείται κάτω από λυχνία υπεριώδους (3.2), οι ζώνες των στερολών, των τριτερπενικών διαλκοολών και των αλκοολών μπορούν να αναγνωριστούν από την ευθυγράμμισή τους με τις κηλίδες του διαλύματος αναφοράς (4.11). Σημειώνεται με μαύρο μολύβι το περίγραμμα των ζωνών κατά μήκος των άκρων του φθορισμού (βλέπε εικόνα πλάκας χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας στο σχήμα 1).

Το διοξείδιο του πυριτίου αφαιρείται από τη σημειωμένη επιφάνεια με απόξεση με τη βοήθεια μεταλλικής σπάτουλας. Το αφαιρούμενο θρυμματισμένο υλικό φέρεται σε διηθητική χοάνη (3.4). Προστίθενται 10 ml θερμού οξικού αιθυλεστέρα (4.10) και το σύνολο αναμειγνύεται προσεκτικά με τη μεταλλική σπάτουλα και διηθείται (υπό κενό εάν είναι απαραίτητο). Το διήθημα συλλέγεται στην κωνική φιάλη (3.5) που είναι συνδεδεμένη με τη διηθητική χοάνη.

Το υπόλειμμα εκπλύνεται στη χοάνη τρεις φορές με αιθυλαιθέρα (4.3) (περίπου 10 ml κάθε φορά) και το διήθημα συλλέγεται ομοίως στη φιάλη που είναι συνδεδεμένη με τη διηθητική χοάνη. Το διήθημα εξατμίζεται μέχρι όγκου περίπου 4-5 ml, μεταγγίζεται το υπολειπόμενο διάλυμα μέσα στον προϋψισμένο δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml (3.6) και εξατμίζεται μέχρι ξηρού με ήπια θέρμανση σε ελαφρύ ρεύμα αζώτου. Προστίθενται μερικές σταγόνες ακετόνης (4.6) και εξατμίζεται εκ νέου μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα που περιέχει ο δοκιμαστικός σωλήνας αποτελείται από τα κλάσματα των στερολών και των τριτερπενικών διαλκοολών ή των αλκοολών και των τριτερπενικών αλκοολών.

6. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΛΚΟΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ HPLC

Οι ασαπωνοποιητές ύλες που λαμβάνονται από το μέρος 1 διαλύονται σε 3 ml της κινητής φάσης (4.14), το διάλυμα διηθείται με φίλτρο σύριγγας (3.10) και φυλάσσεται.

Εγχύονται 200 μL του διηθημένου διαλύματος ασαπωνοποιητών υλών στην HPLC (3.8).

Εκτελείται ο διαχωρισμός HPLC στα 0,8 mL/λεπτό, τα κλάσματα απορρίπτονται κατά τα πρώτα 5 λεπτά και συλλέγονται σε κωνικές φιάλες των 25 mL (3.11) από το 5ο έως το 10ο λεπτό για τις αλειφατικές και τριτερπενικές αλκοόλες και από το 11ο έως το 25ο λεπτό για τις στερόλες και την ερυθροδιόλη και ουβαόλη (σημείωση 5).

Η παρακολούθηση του διαχωρισμού είναι δυνατή με ανιχνευτή υπεριώδους σε μήκος κύματος 210 nm ή με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (βλέπε σχήμα 6).

Τα κλάσματα εξατμίζονται μέχρι ξηρού και ετοιμάζονται για χρωματογραφική ανάλυση.

Σημείωση 5: Ελέγχετε προσεκτικά την πίεση της αντλίας HPLC, καθώς ο αιθυλαιθέρας μπορεί να αυξήσει την πίεση. Προσαρμόζετε τη ροή για να διατηρείτε την πίεση υπό έλεγχο.

ΜΕΡΟΣ 3

ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

1. ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Το παρόν μέρος παρέχει γενικές οδηγίες για την εφαρμογή της αεριοχρωματογραφίας τριχοειδούς στήλης για τον προσδιορισμό της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης των αλκοολούχων ενώσεων οι οποίες απομονώνονται με τη μέθοδο που προσδιορίζεται στο μέρος 2 της παρούσας μεθόδου.

▼ M32**2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Τα κλάσματα που συλλέγονται από τις ασαπωνοποίητες ύλες με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) ή υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) παραγωγοποιούνται σε τριμεθυλοσιλυλαιθέρους και αναλύονται μέσω αεριοχρωματογραφίας τριχοειδούς στήλης με σύστημα έγχυσης με διαμοιρασμό και με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και, ειδικότερα, τα εξής:

3.1. Δοκιμαστικός σωλήνας των 10 ml με κωνικό πυθμένα και με γυάλινο πώμα ασφαλείας.

3.2. Αεριοχρωματογράφος, κατάλληλος για λειτουργία με τριχοειδή στήλη, εφοδιασμένος με σύστημα έγχυσης με διαμοιρασμό (split injector), αποτελούμενος από:

3.2.1. θερμοστατούμενο θάλαμο για στήλες, που επιτρέπει να διατηρείται η επιθυμητή θερμοκρασία με ακρίβεια ± 1 °C.

3.2.2. μονάδα έγχυσης με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία, ψεκαστικό στοιχείο από υπερσιλανωμένο γυαλί και σύστημα διαμοιρασμού.

3.2.3. ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID).

3.2.4. σύστημα απόκτησης δεδομένων κατάλληλο για χρήση με τον ανιχνευτή FID (3.10.3.), με δυνατότητα μη αυτόματης ολοκλήρωσης.

3.3. Τριχοειδής στήλη από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, μήκους 20 έως 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, επιστρωμένη με διφαινύλιο 5 % - διμεθυλοπολυσιλοξάνιο 95 % (στατική φάση SE-52 ή SE-54 ή ανάλογη), ομοιόμορφου πάχους 0,10 έως 0,30 μm.

3.4. Μικροσύριγγα των 10 μl για αεριοχρωματογραφία, με μη αποσπώμενη βελόνα, κατάλληλη για έγχυση με διαμοιρασμό.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

4.1. Άνυδρη πυριδίνη, χρωματογραφικής καθαρότητας.

4.2. Εξαμεθυλοδισιλαζάνιο, αναλυτικής καθαρότητας.

4.3. Τριμεθυλοχλωροσιλάνιο, αναλυτικής καθαρότητας.

4.4. Διαλύματα δείγματος τριμεθυλοσιλυλαιθέρων των στερολών. Παρασκευάζονται κατά τον χρόνο της χρήσης από στερόλες και ερυθροδιόλη, προερχόμενες από τα έλαια που τις περιέχουν.

4.5. Πρότυπα διαλύματα τριμεθυλοσιλυλαιθέρων των αλειφατικών αλκοολών από C20 έως C28. Μπορούν να παρασκευάζονται τη στιγμή της χρήσης από μείγματα καθαρών αλκοολών.

4.6. Φέρον αέριο: υδρογόνο ή ήλιο, αεριοχρωματογραφικής καθαρότητας.

4.7. Βοηθητικά αέρια: υδρογόνο, ήλιο, άζωτο και αέρας, αεριοχρωματογραφικής καθαρότητας.

4.8. Αντιδραστήριο σιλλύωσης, το οποίο είναι μείγμα πυριδίνης/εξαμεθυλοδισιλαζάνιου/τριμεθυλοχλωροσιλάνιου 9:3:1 (V/V/V).

4.9. n-εξάνιο, χρωματογραφικής καθαρότητας.

▼ **M32**

5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΤΡΙΜΕΘΥΛΟΣΙΛΥΛΑΙΘΕΡΩΝ

Στον δοκιμαστικό σωλήνα (3.1) που περιέχει το κλάσμα αλκοολούχων ενώσεων προστίθεται το αντιδραστήριο σιλυλίωσης (4.8) (σημείωση 6), σε αναλογία 50 μl ανά χιλιοστόγραμμα αλκοολούχου ένωσης, αποφεύγοντας κάθε απορρόφηση υγρασίας (σημείωση 7).

Σημείωση 6: Υπάρχουν στο εμπόριο διαλύματα έτοιμα προς χρήση. Διατίθενται στο εμπόριο και άλλα σιλυλιωτικά αντιδραστήρια, όπως π.χ. το δις(τριμεθυλοσιλυλο)τριφθορακεταμίδιο + 1 % τριμεθυλοχλωροσιλάνιο, το οποίο πρέπει να αραιώνεται με ίσο όγκο άνυδρης πυριδίνης. Η πυριδίνη μπορεί να αντικατασταθεί από την ίδια ποσότητα ακετονιτριλίου.

Σημείωση 7: Η ενδεχόμενη εμφάνιση ελαφρού γαλακτώδους ιριδισμού είναι φυσιολογική και δεν προκαλεί κανένα πρόβλημα. Ένδειξη παρουσίας υγρασίας ή αλλοίωσης του αντιδραστηρίου αποτελεί ο σχηματισμός λευκών νιφάδων ή η εμφάνιση ρόδινου χρώματος. Στις περιπτώσεις αυτές, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί (μόνο εάν χρησιμοποιείται μείγμα εξαμεθυλοδισιλαζανίου/τριμεθυλοχλωροσιλανίου).

Ο δοκιμαστικός σωλήνας πωματίζεται (3.1), ανακινείται προσεκτικά (χωρίς αναστροφή) έως την πλήρη διαλυτοποίηση των ενώσεων. Αφήνεται σε ηρεμία για 15 τουλάχιστον λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν φυγοκεντρείται για μερικά λεπτά: το διαυγές διάλυμα είναι έτοιμο για αεριοχρωματογραφική ανάλυση.

6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

6.1. Προκαταρκτικές εργασίες, σταθεροποίηση της τριχοειδούς στήλης

Τοποθετείται η στήλη (3.3) στον αεριοχρωματογράφο και συνδέεται το άκρο εισόδου με το σύστημα έγχυσης με διαμοιρασμό και το άκρο εξόδου με τον ανιχνευτή.

Διενεργούνται οι συνήθεις έλεγχοι της αεριοχρωματογραφικής μονάδας (διαρροές από τα κυκλώματα των αερίων, απόδοση του ανιχνευτή, του συστήματος διαμοιρασμού και του συστήματος καταγραφής κ.λπ.).

Εάν η στήλη χρησιμοποιείται για πρώτη φορά, συνιστάται να προηγηθεί σταθεροποίηση: διοχετεύεται ελαφρύ ρεύμα αερίου διαμέσου της στήλης, στη συνέχεια τίθεται σε λειτουργία η αεριοχρωματογραφική μονάδα και αρχίζει βαθμιαία θέρμανση μέχρις ότου η θερμοκρασία υπερβεί κατά τουλάχιστον 20 °C εκείνη της κανονικής λειτουργίας (σημείωση 8). Η θερμοκρασία αυτή διατηρείται για δύο ώρες τουλάχιστον, κατόπιν ολόκληρη η μονάδα τίθεται σε κατάσταση λειτουργίας (ρύθμιση της ροής των αερίων και του διαμοιρασμού, έναυση της φλόγας, σύνδεση με το υπολογιστικό σύστημα, ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης, του ανιχνευτή και του συστήματος έγχυσης κ.λπ.) και, στη συνέχεια, καταγράφεται το σήμα με ευαισθησία τουλάχιστον διπλάσια της σκοπούμενης για την ανάλυση. Η γραμμή βάσης πρέπει να είναι ευθεία, χωρίς κανενός είδους κορυφή, και να μην παρουσιάζει ολίσθηση. Τυχόν αρνητική ευθύγραμμη ολίσθηση υποδηλώνει ατελή στεγανότητα των συνδέσεων της στήλης, ενώ η θετική ολίσθηση υποδηλώνει ανεπαρκή σταθεροποίηση της στήλης.

Σημείωση 8: Η θερμοκρασία σταθεροποίησης πρέπει να είναι πάντοτε χαμηλότερη κατά 20 °C τουλάχιστον από τη μέγιστη θερμοκρασία που προβλέπεται στις προδιαγραφές της χρησιμοποιούμενης στατικής φάσης.

6.2. Συνθήκες λειτουργίας

Ρυθμίστε κατά τον βέλτιστο τρόπο το πρόγραμμα θερμοκρασίας και τη ροή του φέροντος αερίου ώστε να λαμβάνονται χρωματογραφήματα παρόμοια με τα σχήματα 3 έως 6.

Έχουν δοκιμαστεί και έχουν αποδειχτεί χρήσιμες οι ακόλουθες παράμετροι:

▼ **M32**

6.2.1. Αλειφατικές αλκοόλες

Πρόγραμμα κλιβάνου	180 °C (8 λεπτά) → 260 °C (στα 5 °C/λεπτό) → 260 °C (15 λεπτά)
Θερμοκρασία συστήματος έγχυσης	280 °C
Θερμοκρασία του ανιχνευτή	290 °C
Γραμμική ταχύτητα του φέροντος αερίου	Ήλιο (20 έως 30 cm/s)· Υδρογόνο (30 έως 50 cm/s)
Αναλογία διαμοιρασμού	1:50 έως 1:100
Εγχύμενος όγκος	0,5 έως 1 μl διαλύματος τριμεθυλοσιλυλαιθέρων (TMSE)

6.2.2. Στερόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες

Πρόγραμμα κλιβάνου	260 ± 5 °C ισόθερμη θερμοκρασία
Θερμοκρασία συστήματος έγχυσης	280 – 300 °C
Θερμοκρασία του ανιχνευτή	280 – 300 °C
Γραμμική ταχύτητα του φέροντος αερίου	Ήλιο (20 έως 30 cm/s)· Υδρογόνο (30 έως 50 cm/s)
Αναλογία διαμοιρασμού	1:50 έως 1:100
Εγχύμενος όγκος	0,5 έως 1 μl διαλύματος τριμεθυλοσιλυλαιθέρων (TMSE)

Οι συνθήκες αυτές μπορούν να μεταβάλλονται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της στήλης και του αεριοχρωματογράφου, ώστε να λαμβάνονται χρωματογραφήματα που να πληρούν τις ακόλουθες απαιτήσεις:

- Ο χρόνος κατακράτησης της αλκοόλης C26 θα πρέπει να είναι 18 ± 5 λεπτά.
- Η κορυφή της αλκοόλης C22 θα πρέπει να είναι 80 ± 20 % της πλήρους κλίμακας για το ελαιόλαδο και 40 ± 20 % της πλήρους κλίμακας για το πυρηνέλαιο.
- Ο χρόνος κατακράτησης για την κορυφή της β-σιτοστερόλης θα πρέπει να είναι 20 ± 5 λεπτά.
- Η κορυφή της καμπεστερόλης θα πρέπει να είναι: για το ελαιόλαδο (μέση περιεκτικότητα 3 %) 20 ± 5 % της πλήρους κλίμακας.
- Πρέπει να διαχωρίζονται όλες οι περιεχόμενες στερόλες. Οι κορυφές, πέραν του διαχωρισμού τους, πρέπει να είναι και τελείως διακριτές, δηλαδή το ίχνος κάθε κορυφής θα πρέπει να επιστρέφει στη γραμμή βάσης πριν αρχίσει να διαγράφεται η επόμενη κορυφή. Η ανεπαρκής διαχωριστική ικανότητα είναι, παρ' όλα αυτά, ανεκτή, υπό την προϋπόθεση ότι η κορυφή που αντιστοιχεί στον χρόνο κατακράτησης 1,02 (σιτοστανόλη) είναι ποσοτικά μετρήσιμη με τη χρήση της καθέτου.

6.3. Εκτέλεση της ανάλυσης

Με τη μικροσύριγγα των 10 μl (3.4) λαμβάνεται 1 μl εξανίου, αναροφάται 0,5 μl αέρα και στη συνέχεια 0,5 έως 1 μl του διαλύματος του δείγματος. Ανυψώνεται λίγο ακόμη το έμβολο της σύριγγας ώστε να κενωθεί η βελόνα. Εισάγεται η βελόνα στη μεμβράνη του συστήματος έγχυσης και μετά από ένα έως δύο δευτερόλεπτα εγχέεται ταχύτατα το περιεχόμενό της. Στη συνέχεια, έπειτα από πέντε δευτερόλεπτα περίπου, η βελόνα αποσύρεται αργά. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης αυτόματο σύστημα έγχυσης.

▼ **M32**

Εκτελείται καταγραφή μέχρι πλήρους έκλουσης των TMSE των αντίστοιχων υπαρχουσών αλκοολούχων ενώσεων. Η γραμμική βάση πρέπει να εξακολουθεί να πληροί τις απαιτήσεις των αντίστοιχων συνθηκών λειτουργίας (6.2.1 ή 6.2.2).

6.4. Ταυτοποίηση των κορυφών

Οι κορυφές ταυτοποιούνται βάσει των χρόνων κατακράτησης και μέσω σύγκρισης με το μείγμα TMSE των αλειφατικών και τριτερπενικών διαλκοολών ή των στερολών και των τριτερπενικών διαλκοολών που έχει υποβληθεί σε ανάλυση υπό τις ίδιες συνθήκες. Στο σχήμα 3 απεικονίζεται χρωματογράφημα του κλάσματος των αλειφατικών και τριτερπενικών αλκοολών και στο σχήμα 2 απεικονίζονται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα για τις στερόλες και τις τριτερπενικές διαλκοόλες.

Οι αλειφατικές αλκοόλες εκλύονται με την ακόλουθη σειρά: C20-όλη (εσωτερικό πρότυπο), C22-όλη, C23-όλη, C24-όλη, C25-όλη, C26-όλη, C27-όλη και C28-όλη.

Οι στερόλες και οι τριτερπενικές διαλκοόλες εκλύονται με την ακόλουθη σειρά: χοληστερόλη, βρασικαστερόλη, εργοστερόλη, 24-μεθυλενοχοληστερόλη, καμπεστερόλη, καμπεστανόλη, στιγμαστερόλη, δ-7-καμπεστερόλη, δ-5,23-στιγμασταδιενόλη, κλεροστερόλη, β-σιτοστερόλη, σιτοστανόλη, δ-5-αβεναστερόλη, δ-5,24-στιγμασταδιενόλη, δ-7-στιγμαστενόλη, δ-7-αβεναστερόλη, ερυθροδιόλη και ουβαόλη.

6.5. Ποσοτικός προσδιορισμός

Χρησιμοποιώντας σύστημα απόκτησης δεδομένων, προβαίνουμε στον υπολογισμό του εμβαδού των κορυφών της 1-εικοσανόλης και των αλειφατικών αλκοολών C22, C24, C26 και C28. Ο συντελεστής απόκρισης για την 1-εικοσανόλη θα πρέπει να θεωρείται ότι ισούται με 1.

Με τη βοήθεια του υπολογιστικού συστήματος υπολογίζονται τα εμβαδά των κορυφών που αντιστοιχούν στην α-χολεστανόλη και στις στερόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες. Δεν λαμβάνονται υπόψη οι κορυφές ενώσεων που δεν περιλαμβάνονται στις ενώσεις του πίνακα 1 (δεν πρέπει να υπολογίζεται η εργοστερόλη). Ο συντελεστής απόκρισης για την α-χολεστανόλη θα πρέπει να θεωρείται ότι ισούται με 1.

Υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε αλκοολούχου ένωσης χωριστά, σε mg/kg λιπαρής ουσίας, ως ακολούθως:

$$\text{Αλκοολούχος ένωση } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1000$$

όπου:

A_x = εμβαδόν της κορυφής της αλκοολούχου ένωσης x, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

A_s = εμβαδόν της κορυφής της 1-εικοσανόλης/α-χολεστανόλης, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

m_s = μάζα της 1-εικοσανόλης/α-χολεστανόλης που προστέθηκε, σε χιλιοστόγραμμα.

m = μάζα του δείγματος που ελήφθη για τον προσδιορισμό, σε γραμμάρια.

7. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αναφέρονται οι συγκεντρώσεις των επιμέρους αλειφατικών και τριτερπενικών αλκοολών σε mg/kg λιπαρής ουσίας, καθώς και το άθροισμά τους ως «ολική περιεκτικότητα σε αλειφατικές αλκοόλες». Η ολική περιεκτικότητα είναι το άθροισμα των C22, C24, C26 και C28.

Η σύνθεση κάθε επιμέρους αλκοολούχου ένωσης θα πρέπει να εκφράζεται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

Η συγκέντρωση σε ολικές στερόλες θα πρέπει να εκφράζεται χωρίς δεκαδικά ψηφία.

▼ **M32**

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

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

όπου:

A_x = εμβαδόν της κορυφής της στερόλης x.

ΣA = άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών των στερολών.

Φαινόμενη β-σιτοστερόλη: Δ-5,23-στιγμασταδιενόλη + κλεροστερόλη + β-σιτοστερόλη + σιτοστανόλη + Δ-5-αβεναστερόλη + Δ-5,24-στιγμασταδιενόλη.

Υπολογίζεται η εκατοστιαία αναλογία ερυθροδιόλης και ουβαόλης:

$$\text{Ερυθροδιόλη} + \text{Ουβαόλη} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

όπου:

A_{Er} = εμβαδόν της κορυφής της ερυθροδιόλης, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

A_{Uv} = εμβαδόν της κορυφής της ουβαόλης, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

ΣA_T = αθροιστικό εμβαδόν των κορυφών των στερολών + της ερυθροδιόλης + της ουβαόλης σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

Πέραν του υπολογισμού της σχετικής εκατοστιαίας αναλογίας για τις μεμονωμένες στερόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες και της ολικής συγκέντρωσης στερολών, πρέπει να υπολογίζεται η συγκέντρωση ερυθροδιόλης και ουβαόλης καθώς και το άθροισμά τους σε mg/kg λιπαρής ουσίας, σύμφωνα με τους ακόλουθους τύπους:

$$\text{Ερυθροδιόλη} = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$\text{Ουβαόλη} = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

όπου:

A_{Er} = εμβαδόν της κορυφής της ερυθροδιόλης, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

A_{Uv} = εμβαδόν της κορυφής της ουβαόλης, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

A_s = εμβαδόν της κορυφής της α-χολεστανόλης, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

m_s = μάζα της α-χολεστανόλης που προστέθηκε, σε χιλιοστόγραμμα.

m = μάζα του δείγματος που ελήφθη για τον προσδιορισμό, σε γραμμάρια.

▼ **M32**

Προσάρτημα



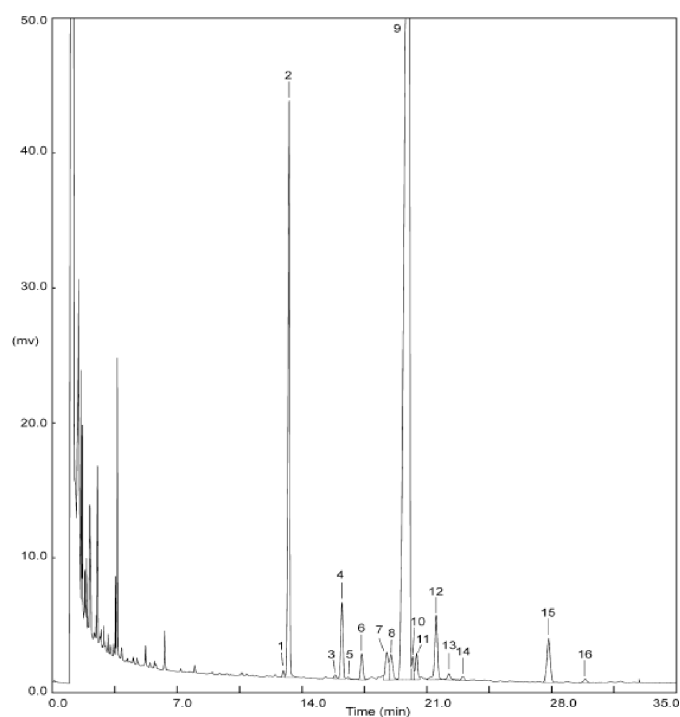
Σχήμα 1 — Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας του κλάσματος ασαπωνοποιήτων υλών από πυρηνέλαιο που εκλούεται δύο φορές με εξάνιο:διαιθυλαιθέρα (65:35), που αναπτύσσεται με SO₄H₂ (50 %) και θερμαίνεται. Οι ζώνες που θα πρέπει να αποξεστούν είναι αυτές που περιλαμβάνονται στο παραλληλόγραμμα: 1 είναι οι ζώνες για τις αλειφατικές αλκοόλες και 2 οι ζώνες για τις στερόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες.

Πίνακας I — Σχετικοί χρόνοι κατακράτησης των στερολών

Κορυφή	Ταυτοποίηση		Σχετικός χρόνος κατακράτησης	
			Στήλη SE 54	Στήλη SE 52
1	Χοληστερόλη	Δ-5-χοληστεν-3β-όλη	0,67	0,63
2	Χολεστανόλη	5α-χολησταν-3β-όλη	0,68	0,64
3	Βρασικαστερόλη	[24S]-24-μεθυλο-Δ-5,22-χολησταδιεν-3β-όλη	0,73	0,71
*	Εργοστερόλη	[24S]-24-μεθυλο-Δ-5,7,22-χοληστατριεν-3β-όλη	0,78	0,76
4	24-μεθυλενο-χοληστερόλη	24-μεθυλενο-Δ-5,24-χολησταδιεν-3β-όλη	0,82	0,80
5	Καμπεστερόλη	(24R)-24-μεθυλο-Δ-5-χοληστεν-3β-όλη	0,83	0,81
6	Καμπεστανόλη	(24 R)-24-μεθυλο-χολησταν-3β-όλη	0,85	0,82
7	Στιγμαστερόλη	(24S)-24-αιθυλο-Δ-5,22-χολησταδιεν-3β-όλη	0,88	0,87
8	Δ-7-καμπεστερόλη	(24R)-24-μεθυλο-Δ-7-χοληστεν-3β-όλη	0,93	0,92
9	Δ-5,23-στιγμασταδιενόλη	(24R,S)-24-αιθυλο-Δ-5,23-χολησταδιεν-3β-όλη	0,95	0,95
10	Κλεροστερόλη	(24S)-24-αιθυλο-Δ-5,25-χολησταδιεν-3β-όλη	0,96	0,96

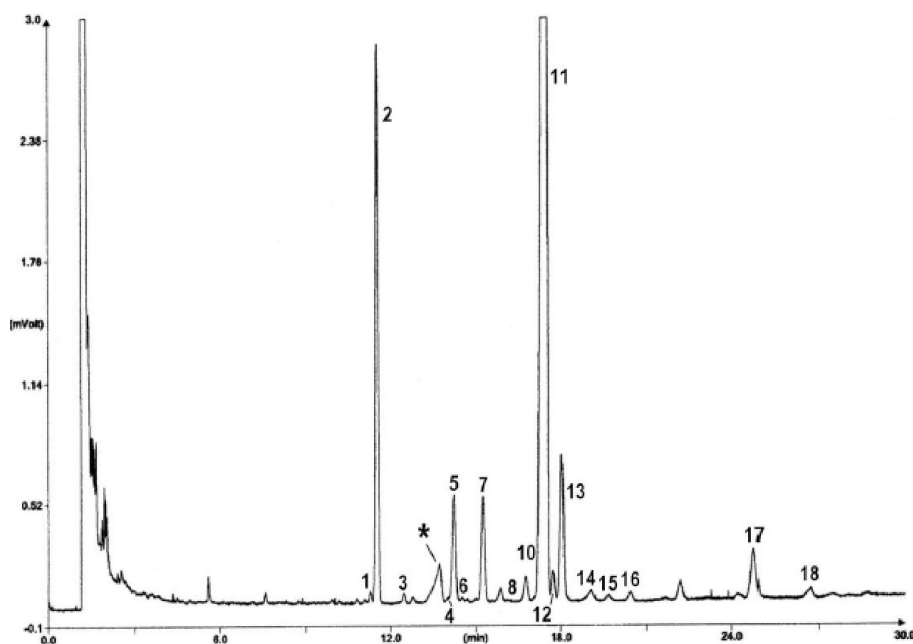
▼ M32

Κορυφή	Ταυτοποίηση		Σχετικός χρόνος κατακράτησης	
			Στήλη SE 54	Στήλη SE 52
11	β-σιτοστερόλη	(24R)-24-εθυλο-Δ-5-χοληστεν-3β-όλη	1,00	1,00
12	Σιτοστανόλη	24-αιθυλο-χολησταν-3β-όλη	1,02	1,02
13	Δ-5-αβεναστερόλη	(24Z)-24-αιθυλιδενο-Δ-χοληστεν-3β-όλη	1,03	1,03
14	Δ-5,24-στιγμασταδιενόλη	(24R,S)-24-αιθυλο-Δ-5,24-χολησταδιεν-3β-όλη	1,08	1,08
15	Δ-7-στιγμαστενόλη	(24R,S)-24-αιθυλο-Δ-7-χοληστεν-3β-όλη	1,12	1,12
16	Δ-7-αβεναστερόλη	(24Z)-24-αιθυλιδενο-Δ-7-χοληστεν-3β-όλη	1,16	1,16
17	Ερυθροδιόλη	5α-ελαιαν-12-εν-3β,28-διόλη	1,41	1,41
18	Ουβαόλη	Δ-12-ουρσεν-3β,28-διόλη	1,52	1,52

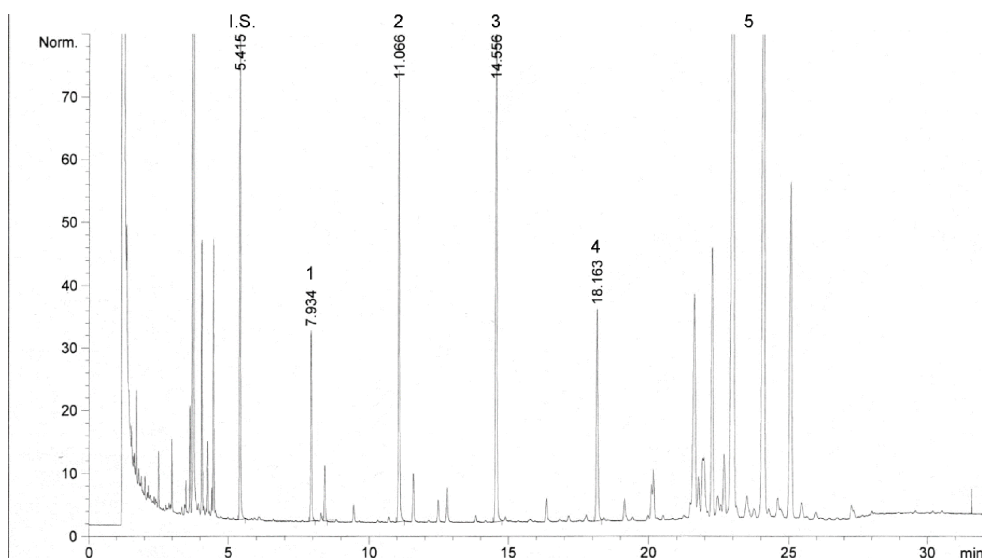


Σχήμα 2 — Χρωματογραφικό προφίλ GC-FID των στερολών και τριτερπενικών διαλκοολών από εξευγενισμένο ελαιόλαδο. (1) Χοληστερόλη, (2) α-χολεστανόλη (εσωτερικό πρότυπο), (3) 24-μεθυλενο-χοληστερόλη, (4) καμπεστερόλη, (5) 24-αιθυλο-χοληστερόλη, (6) σιγμαστερόλη, (7) δ-5,23-στιγμασταδιενόλη, (8) κλεροστερόλη, (9) β-σιτοστερόλη, (10) σιτοστανόλη, (11) δ-5-αβεναστερόλη, (12) δ-5,24-στιγμασταδιενόλη, (13) δ-7-στιγμαστενόλη, (14) δ-7-αβεναστερόλη, (15) ερυθροδιόλη, (16) ουβαόλη.

▼ M32

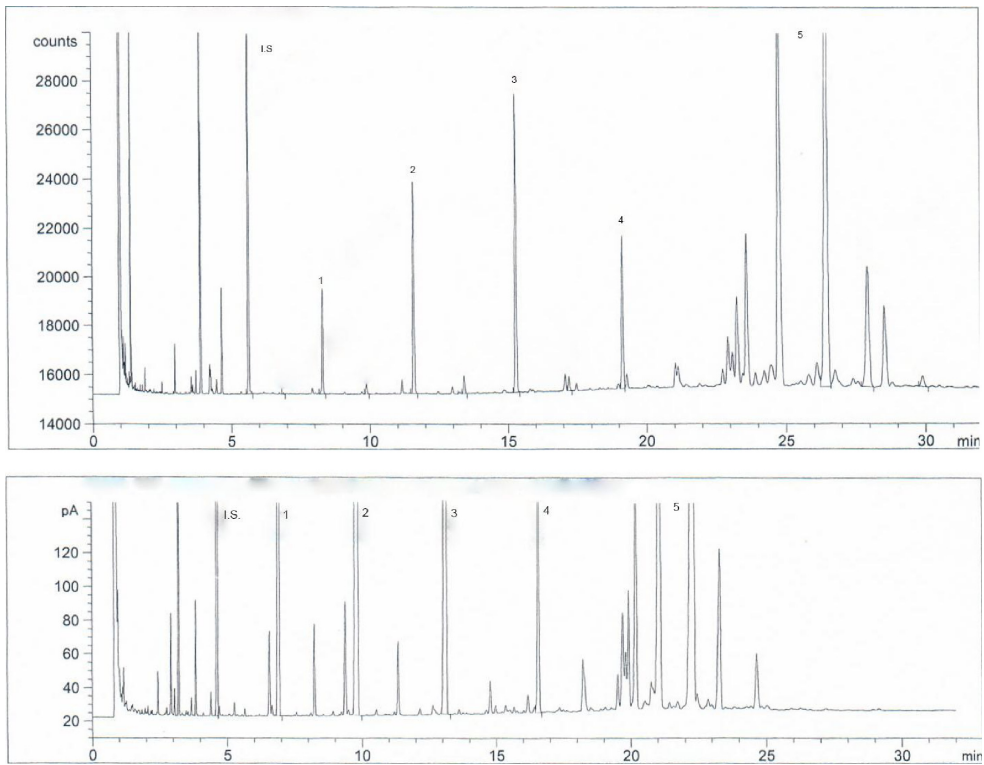


Σχήμα 3 — Χρωματογραφικό προφίλ GC-FID των στερολών και τριτερπενικών διαλκοολών από μειονεκτικό ελαιόλαδο (λαμπάντε). (1) Χοληστερόλη, (2) α-χολεστανόλη, (3) βρασικαστερόλη, (4) 24-μεθυλενο-χοληστερόλη, (5) καμπεστερόλη, (6) καμπεστανόλη, (7) στιγμαστερόλη, (8) δ-7-καμπεστερόλη, (9) δ-5,23-στιγμασταδιενόλη, (10) κλεροστερόλη, (11) β-σιτοστερόλη, (12) σιτοστανόλη, (13) δ-5-αβεναστερόλη, (14) δ-5,24-στιγμασταδιενόλη, (15) δ-7-στιγμαστενόλη, (16) δ-7-αβεναστερόλη, (17) ερυθροδιόλη, (18) ουβαόλη.

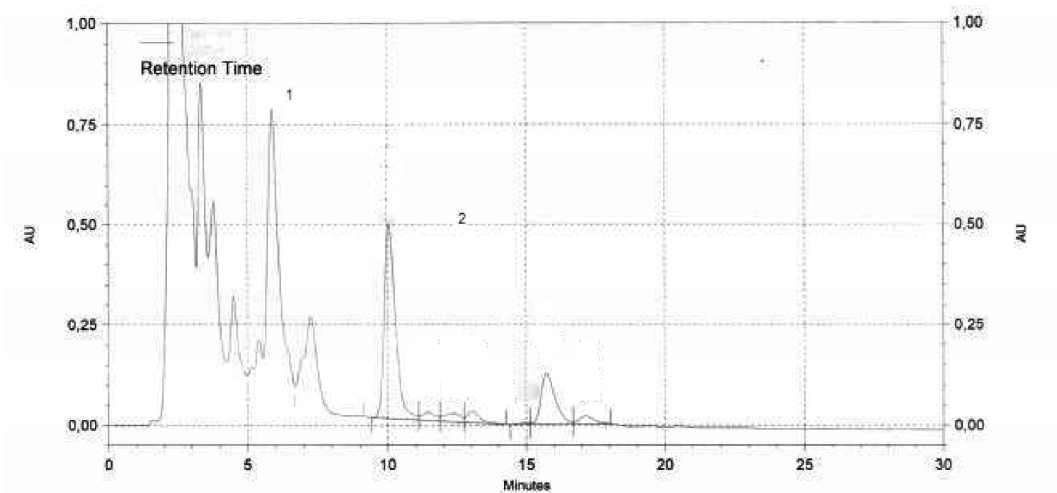


Σχήμα 4 — Χρωματογραφικό προφίλ GC-FID των αλειφατικών αλκοολών και τριτερπενικών αλκοολών ελαιόλαδου. (εσωτερικό πρότυπο) C20-όλη, (1) C22-όλη, (2) C24-όλη, (3) C26-όλη, (4) C28-όλη, (5) τριτερπενικές αλκοόλες.

▼ M32



Σχήμα 5 — Χρωματογραφικό προφίλ GC-FID των αλειφατικών αλκοολών και τριτερπενικών αλκοολών εξευγενισμένου ελαιόλαδου και ελαιόλαδου δεύτερης φυγοκέντρωσης. (εσωτερικό πρότυπο) C20-όλη, (1) C22-όλη, (2) C24-όλη, (3) C26-όλη, (4) C28-όλη, (5) τριτερπενικές αλκοόλες.



Σχήμα 6 — Χρωματογράφημα HPLC ασαπυνοποιητών υλών ελαιόλαδου διαχωρισμένων με HPLC με τη χρήση ανιχνευτή υπεριώδους. (1) Αλειφατικές και τριτερπενικές αλκοόλες (2) Στερόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες.

▼ **M23***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΧΧ***Μέθοδος προσδιορισμού της περιεκτικότητας σε κήρους, καθώς και σε μεθυλεστέρες ακι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης**

1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μεθόδου είναι ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των ελαιολάδων σε κηρούς, καθώς και σε μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων. Οι επιμέρους κηροί και αλκυλεστέρες διαχωρίζονται ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα. Η μέθοδος συνιστάται ως μέσο διάκρισης μεταξύ ελαιολάδου και πυρηελαιίου και ως παράμετρος ποιότητας των εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων, βάσει της οποίας είναι δυνατόν να εντοπιστεί η παράνομη ανάμιξη εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων με έλαια κατώτερης ποιότητας, ανεξαρτήτως του εάν αυτά είναι παρθένα ελαιόλαδα, μειοεκτικά ελαιόλαδα (λαμπάντε) ή ορισμένα αποσμημένα έλαια.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προσθήκη κατάλληλων εσωτερικών προτύπων στο έλαιο και κλασματικός διαχωρισμός με χρωματογραφία σε στήλη ένυδρου διοξειδίου του πυριτίου (silica gel). Παραλαβή του κλάσματος που εκλύεται στις συνθήκες της δοκιμής (με πολικότητα μικρότερη εκείνης των τριακυλογλυκερολών) και απευθείας ανάλυση με αεριοχρωματογραφία τριχοειδούς στήλης.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

3.1. **Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) των 25 ml**

3.2. **Γυάλινη στήλη** για υδροχρωματογραφία, εσωτερικής διαμέτρου 15 mm και μήκους 30-40 cm, εφοδιασμένη με κατάλληλη στρόφιγγα

3.3. **Αεριοχρωματογράφος** κατάλληλος για χρήση με τριχοειδή στήλη, εφοδιασμένος με σύστημα απευθείας εισαγωγής του δείγματος στη στήλη (on-column) και αποτελούμενος από:

3.3.1. **Θερμοστατούμενο κλίβανο με προγραμματισμό της θερμοκρασίας**

3.3.2. **Ψυχρό εγχυτήρα** για την απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη

3.3.3. **Ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και μετατροπέα-ενισχυτή**

3.3.4. **Καταγράφεα-ολοκληρωτή** (σημείωση 1) για χρήση με τον μετατροπέα-ενισχυτή (σημείο 3.3.3), με χρόνο απόκρισης που δεν υπερβαίνει το 1 δευτερόλεπτο και με μεταβλητή ταχύτητα χαρτιού

Σημείωση 1: Μπορούν επίσης να χρησιμοποιούνται ηλεκτρονικά συστήματα, στα οποία τα αεριοχρωματογραφικά δεδομένα εισάγονται μέσω προσωπικού υπολογιστή.

3.3.5. **Τριχοειδή στήλη από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (για ανάλυση κηρών, μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων)**, μήκους 8 έως 12 μέτρων και εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, επιστρωμένη εσωτερικά με υγρή φάση (σημείωση 2) ομοιόμορφου πάχους 0,10 έως 0,30 μm

Σημείωση 2: Στο εμπόριο κυκλοφορούν κατάλληλες για τον σκοπό αυτό υγρές φάσεις, όπως οι SE 52, SE 54 κ.λπ.

3.4. **Μικροσύριγγα** των 10 μl, με συγκολλημένη στο σώμα της βελόνα, για την απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη

3.5. **Ηλεκτρικό τάρακτρο**

3.6. **Περιστροφικός εξεταμιστήρας**

3.7. **Θερμομονωμένος κλίβανος**

3.8. **Αναλυτικός ζυγός** για ζυγίσεις με ακρίβεια $\pm 0,1$ mg

▼ **M23**

3.9. Συνήθη εργαστηριακά γυάλινα σκεύη

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

4.1. **Διοξείδιο του πυριτίου (silica gel)** κοκκομετρικού βαθμού 60-200 μm. Τοποθετείται το silica gel στον θερμομονωμένο κλίβανο όπου παραμένει σε θερμοκρασία 500 °C επί 4 ώρες τουλάχιστον. Αφήνεται να ψυχθεί και, έπειτα, προστίθεται νερό σε αναλογία 2 % της χρησιμοποιηθείσας ποσότητας silica gel. Το υδαρές μείγμα ανακινείται έντονα ώστε να ομοιογενοποιηθεί και φυλάσσεται στον ξηραντήρα τουλάχιστον επί 12 ώρες πριν χρησιμοποιηθεί.

▼ **M32**

4.2. n-εξάνιο, χρωματογραφικής καθαρότητας ή καθαρότητας για ανάλυση υπολειμμάτων. Το εξάνιο μπορεί να αντικατασταθεί από ισοοκτάνιο (2,2,4-τριμεθυλοπεντάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας), υπό τον όρο ότι επιτυγχάνονται συγκρίσιμες τιμές πιστότητας. Αν και απαιτείται περισσότερο χρόνος για την εξάτμιση των διαλυτών με υψηλότερο σημείο ζέσεως από το n-εξάνιο, οι διαλύτες αυτοί προτιμώνται λόγω της τοξικότητας του εξανίου. Η καθαρότητα πρέπει να ελέγχεται για παράδειγμα, μπορεί να ελεγχθεί το υπόλειμμα μετά την εξάτμιση 100 ml διαλύτη.

ΠΡΟΣΟΧΗ – Υπάρχει πιθανότητα ανάφλεξης ατμών. Να διατηρείται μακριά από πηγές θερμότητας, σπινθήρες ή γυμνή φλόγα. Να εξακριβώνεται ότι οι φιάλες είναι πάντα πωματισμένες σωστά. Να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εξαερισμός κατά τη χρήση. Να αποφεύγεται η συγκέντρωση ατμών και να απομακρύνεται κάθε πιθανός κίνδυνος πυρκαγιάς, όπως θερμαντικές ή ηλεκτρικές συσκευές που δεν είναι κατασκευασμένες από άφλεκτο υλικό. Εξαιρετικά επιβλαβές μέσω της εισπνοής, διότι μπορεί να βλάψει τα νευρικά κύτταρα. Να αποφεύγεται η εισπνοή των ατμών. Εάν χρειάζεται, να χρησιμοποιείται κατάλληλη αναπνευστική συσκευή. Να αποφεύγεται η επαφή με τους οφθαλμούς και το δέρμα.

Το ισοοκτάνιο είναι εύφλεκτο υγρό που παρουσιάζει κίνδυνο πυρκαγιάς. Τα όρια εκρηκτικότητας στον αέρα είναι 1,1 % έως 6,0 % (κλάσμα όγκου). Τοξικό σε περίπτωση κατάποσης και εισπνοής. Να χρησιμοποιείται απαγωγός εξαερισμού σε καλή κατάσταση λειτουργίας για εργασία με αυτόν τον διαλύτη.

▼ **M23**

4.3. **Αιθυλαιθέρας, χρωματογραφικής καθαρότητας**

ΠΡΟΣΟΧΗ – Εξαιρετικά εύφλεκτο και μετρίως τοξικό. Ερεθίζει το δέρμα. Εξαιρετικά επιβλαβές μέσω της εισπνοής. Μπορεί να βλάψει τους οφθαλμούς. Οι επιδράσεις ενδέχεται να εμφανιστούν αργότερα. Μπορεί να σχηματίσει εκρηκτικά υπεροξειδία. Υπάρχει πιθανότητα ανάφλεξης ατμών. Να διατηρείται μακριά από πηγές θερμότητας, σπινθήρες ή γυμνή φλόγα. Να εξακριβώνεται ότι οι φιάλες είναι πάντα πωματισμένες σωστά. Να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εξαερισμός κατά τη χρήση. Να αποφεύγεται η συγκέντρωση ατμών και να απομακρύνεται κάθε πιθανός κίνδυνος πυρκαγιάς, όπως θερμαντικές ή ηλεκτρικές συσκευές που δεν είναι κατασκευασμένες από άφλεκτο υλικό. Να μην εξατμίζεται μέχρι ή σχεδόν μέχρι ξηρού. Ο σχηματισμός υπεροξειδίων είναι δυνατόν να περιοριστεί με την προσθήκη νερού ή κατάλληλου αναγωγικού μέσου. Να μην πίνεται. Να αποφεύγεται η εισπνοή των ατμών. Να αποφεύγεται η παρατεταμένη ή επανειλημμένη επαφή με το δέρμα.

4.4. **κ-επτάνιο, χρωματογραφικής καθαρότητας, ή ισοοκτάνιο**

ΠΡΟΣΟΧΗ – Εύφλεκτο. Εξαιρετικά επιβλαβές μέσω της εισπνοής. Να διατηρείται μακριά από πηγές θερμότητας, σπινθήρες ή γυμνή φλόγα. Να εξακριβώνεται ότι οι φιάλες είναι πάντα πωματισμένες σωστά. Να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εξαερισμός κατά τη χρήση. Να αποφεύγεται η εισπνοή των ατμών. Να αποφεύγεται η παρατεταμένη ή επανειλημμένη επαφή με το δέρμα.

4.5. **Πρότυπο διάλυμα αραχιδικού λαυρυλίου (σημείωση 3) σε επτάνιο, συγκέντρωσης 0,05 % (m/V) (εσωτερικό πρότυπο για τους κηρούς)**

Σημείωση 3: Μπορεί επίσης να χρησιμοποιείται παλμιτικό παλμιτύλιο, στεατικό μυριστύλιο ή λαυρικό αραχιδύλιο.

4.6. **Πρότυπο διάλυμα δεκαεπτανικού μεθυλίου σε επτάνιο, συγκέντρωσης 0,02 % (m/V) (εσωτερικό πρότυπο για τους μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες)**

4.7. **Χρωστική Sudan 1 (1-φαινυλαζωναφθόλη-2)**

▼ **M23****4.8. Φέρον αέριο: υδρογόνο ή ήλιο, καθαρό, αεριοχρωματογραφικής καθαρότητας****ΠΡΟΣΟΧΗ**

Υδρογόνο. Εξαιρετικά εύφλεκτο, υπό πίεση. Να διατηρείται μακριά από πηγές θερμότητας, σπινθήρες, γυμνή φλόγα ή ηλεκτρικές συσκευές που δεν είναι κατασκευασμένες από άφλεκτο υλικό. Να εξακριβώνεται ότι όταν η φιάλη δεν χρησιμοποιείται, η βαλβίδα της είναι κλειστή. Να χρησιμοποιείται πάντα με μειωτήρα πίεσης. Να απελευθερώνεται το ελατήριο του μειωτήρα πριν από το άνοιγμα της βαλβίδας της φιάλης. Να μη στέκεται κανείς μπροστά από το στόμιο εξόδου της φιάλης όταν ανοίγεται η βαλβίδα. Να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εξαερισμός κατά τη χρήση. Να μη μεταφέρεται υδρογόνο από μία φιάλη σε άλλη ούτε να αναμιγνύονται αέρια στη φιάλη. Να εξασφαλίζεται ότι αποκλείεται το ενδεχόμενο ανατροπής των φιαλών. Να διατηρούνται οι φιάλες μακριά από το ηλιακό φως και από πηγές θερμότητας. Να αποθηκεύονται σε περιβάλλον χωρίς διαβρωτικούς παράγοντες. Να μη χρησιμοποιούνται φιάλες που έχουν υποστεί φθορές ή δεν φέρουν επισήμανση.

Ήλιο. Συμπιεσμένο αέριο υπό υψηλή πίεση. Μειώνει τη διαθέσιμη για την αναπνοή ποσότητα οξυγόνου. Να διατηρείται η φιάλη κλειστή. Να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος εξαερισμός κατά τη χρήση. Να μην εισέρχονται άτομα στους χώρους αποθήκευσης εάν δεν εξασφαλίζεται κατάλληλος εξαερισμός. Να χρησιμοποιείται πάντα με μειωτήρα πίεσης. Να απελευθερώνεται το ελατήριο του μειωτήρα πριν από το άνοιγμα της βαλβίδας της φιάλης. Να μη μεταφέρεται αέριο από μία φιάλη σε άλλη. Να εξασφαλίζεται ότι αποκλείεται το ενδεχόμενο ανατροπής των φιαλών. Να μη στέκεται κανείς μπροστά από το στόμιο εξόδου της φιάλης όταν ανοίγεται η βαλβίδα. Να διατηρούνται οι φιάλες μακριά από το ηλιακό φως και από πηγές θερμότητας. Να αποθηκεύονται σε περιβάλλον χωρίς διαβρωτικούς παράγοντες. Να μη χρησιμοποιούνται φιάλες που έχουν υποστεί φθορές ή δεν φέρουν επισήμανση. Να μην εισπνέεται. Να χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τεχνικούς σκοπούς.

4.9. Βοηθητικά αέρια:

— υδρογόνο, καθαρό, αεριοχρωματογραφικής καθαρότητας

— αέρας, καθαρός, αεριοχρωματογραφικής καθαρότητας

ΠΡΟΣΟΧΗ

Αέρας. Συμπιεσμένο αέριο υπό υψηλή πίεση. Να χρησιμοποιείται με προσοχή παρουσία εύφλεκτων ουσιών, καθώς η θερμοκρασία αυτανάφλεξης των περισσότερων από τις οργανικές ενώσεις που περιέχει ο αέρας μειώνεται σημαντικά σε συνθήκες υψηλής πίεσης. Να εξακριβώνεται ότι όταν η φιάλη δεν χρησιμοποιείται, η βαλβίδα της είναι κλειστή. Να χρησιμοποιείται πάντα μειωτήρας πίεσης. Να απελευθερώνεται το ελατήριο του μειωτήρα πριν από το άνοιγμα της βαλβίδας της φιάλης. Να μη στέκεται κανείς μπροστά από το στόμιο εξόδου της φιάλης όταν ανοίγεται η βαλβίδα. Να μη μεταφέρεται αέριο από μία φιάλη σε άλλη, ούτε να αναμιγνύονται αέρια στη φιάλη. Να εξασφαλίζεται ότι αποκλείεται το ενδεχόμενο ανατροπής των φιαλών. Να διατηρούνται οι φιάλες μακριά από το ηλιακό φως και από πηγές θερμότητας. Να αποθηκεύονται σε περιβάλλον χωρίς διαβρωτικούς παράγοντες. Να μη χρησιμοποιούνται φιάλες που έχουν υποστεί φθορές ή δεν φέρουν επισήμανση. Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε συσκευές εισπνοής ή αναπνευστικές αέρας που προορίζεται για τεχνικούς σκοπούς.

5. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**5.1. Ετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης**

Σχηματίζεται εναιώρημα 15 g silica gel (σημείο 4.1) σε κ-εξάνιο (σημείο 4.2), εισάγεται στη στήλη (σημείο 3.2) και αφήνεται προς αυθόρμητη καθίζηση. Η καθίζηση συμπληρώνεται με τη βοήθεια ηλεκτρικού ταράκτρου, ώστε η χρωματογραφική κλίνη να γίνει πιο ομοιογενής. Διηθούνται μέσω της στήλης 30 ml κ-εξανίου για να απομακρυνθούν οι ενδεχόμενες ξένες προσμείξεις. Ζυγίζονται με ακρίβεια στον αναλυτικό ζυγό (σημείο 3.8) περίπου 500 mg δείγματος μέσα στη φιάλη των 25 ml (σημείο 3.1) και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα εσωτερικού προτύπου (σημείο 4.5), ανάλογα με την εκτιμώμενη περιεκτικότητα σε κηρούς. Για παράδειγμα, προστίθεται 0,1 mg αραχιδικού λαυρυλίου στην περίπτωση του ελαιολάδου, 0,25-0,50 mg στην περίπτωση του πυρηνελαίου και 0,05 mg δεκαεπτανικού μεθυλίου (σημείο 4.6) προκειμένου για ελαιόλαδο.

▼ **M23**

Το παρασκευαζόμενο με τον τρόπο αυτό δείγμα μεταφέρεται στη χρωματογραφική στήλη με τη βοήθεια δύο ποσοτήτων κ-εξανίου των 2 ml (σημείο 4.2).

Αφήνεται ο διαλύτης να εκρεύσει μέχρι ύψους 1 mm πάνω από την ανώτερη στάθμη του προσροφητικού υλικού. Διηθείται μέσω της στήλης μείγμα κ-εξανίου/αιθυλαιθέρα (99:1) και συλλέγονται 220 ml με ταχύτητα ροής 15 σταγόνων περίπου ανά 10 δευτερόλεπτα. **(Το κλάσμα αυτό περιέχει τους μεθυλεστέρες, τους αιθυλεστέρες και τους κηρούς.)** (Σημείωση 4) (Σημείωση 5)

Σημείωση 4: Το μείγμα κ-εξανίου/αιθυλαιθέρα (99:1) πρέπει να είναι πρόσφατο και να παρασκευάζεται καθημερινά.

Σημείωση 5: Για τον οπτικό έλεγχο της ορθής έκλουσης των κηρών, είναι δυνατόν να προστεθούν στο διάλυμα του δείγματος 100 μl διαλύματος χρωστικής Sudan I στο μείγμα έκλουσης σε αναλογία 1 %.

Η τιμή του χρόνου κατακράτησης της χρωστικής αυτής περικλείεται μεταξύ των αντίστοιχων τιμών των κηρών και των τριακυλογλυκερολών. Συνεπώς, όταν το χρώμα φθάσει στον πυθμένα της χρωματογραφικής στήλης, η έκλυση πρέπει να διακοπεί, καθώς έχουν εκλουσθεί όλοι οι κηροί.

Τα λαμβανόμενα με τον τρόπο αυτό κλάσματα εξατμίζονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι να απομακρυνθεί σχεδόν τελείως ο διαλύτης. Τα εναπομένοντα 2 ml διαλύτη απομακρύνονται με διαβίβαση ασθενούς ρεύματος αζώτου. Το κλάσμα που περιέχει τους μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες συλλέγεται με 2-4 ml κ-επτανίου ή ισοοκτανίου.

5.2. Αεριοχρωματογραφική ανάλυση

5.2.1. Προκαταρκτικές εργασίες

Τοποθετείται η στήλη στον αεριοχρωματογράφο (σημείο 3.3) και συνδέεται το άκρο εισόδου με το σύστημα απευθείας εισαγωγής του δείγματος και το άκρο εξόδου με τον ανιχνευτή. Ελέγχεται το όργανο αεριοχρωματογραφίας (λειτουργία των βρόχων των αερίων, απόδοση του συστήματος ανιχνευτή και καταγραφέα κ.λπ.).

Εάν η στήλη χρησιμοποιείται για πρώτη φορά, συνιστάται η ρύθμιση των συνθηκών της. Διαβιβάζεται ασθενές ρεύμα αερίου μέσω της στήλης και έπειτα τίθεται σε λειτουργία το όργανο. Αυξάνεται σταδιακά η θερμοκρασία μέχρι να φθάσει, μετά από 4 ώρες περίπου, τους 350 °C.

Η θερμοκρασία αυτή διατηρείται επί 2 τουλάχιστον ώρες και ύστερα ρυθμίζεται το όργανο στις συνθήκες λειτουργίας (ρύθμιση της ροής των αερίων, αφή της φλόγας, σύνδεση με τον ηλεκτρονικό καταγραφέα (σημείο 3.3.4), ρύθμιση της θερμοκρασίας του κλιβάνου για τη στήλη και του ανιχνευτή κ.λπ.). Καταγράφεται το σήμα με ευαισθησία τουλάχιστον διπλάσια της απαιτούμενης για την ανάλυση. Η γραμμή βάσης (baseline) πρέπει να είναι ευθεία, χωρίς καμία κορυφή, και να μην παρουσιάζει απόκλιση (ολίσθηση).

Ευθύγραμμη αρνητική απόκλιση υποδηλώνει εσφαλμένες συνδέσεις της στήλης, ενώ θετική απόκλιση υποδηλώνει ακατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών της στήλης.

5.2.2. Επιλογή των συνθηκών λειτουργίας για κηρούς και για μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες (σημείωση 6)

Κατά κανόνα, εφαρμόζονται οι ακόλουθες συνθήκες εργασίας:

— θερμοκρασία της στήλης:

20 °C/min 5 °C/min

80 °C κατά την έναρξη (1') ————— 140 °C —————
335 °C (20)

— θερμοκρασία του ανιχνευτή: 350 °C,

— εγχέομενη ποσότητα: 1 μl του κ-επτανικού διαλύματος (2-4 ml),

▼ **M23**

- φέρον αέριο: ήλιο ή υδρογόνο με τη βέλτιστη γραμμική ταχύτητα για το επιλεγμένο αέριο (βλ. προσάρτημα Α),
- ευαισθησία των οργάνων: κατάλληλη ώστε να πληρούνται οι ανωτέρω όροι.

Σημείωση 6: Λόγω της υψηλής τελικής θερμοκρασίας, γίνεται δεκτή θετική απόκλιση, η οποία όμως δεν μπορεί να υπερβαίνει το 10 % της τιμής της πλήρους κλίμακας.

Οι συνθήκες αυτές μπορούν να τροποποιούνται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της στήλης και του αεριοχρωματογράφου, ώστε να επιτυγχάνονται διαχωρισμός όλων των κηρών και των μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων λιπαρών οξέων, ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα (βλέπε σχήματα 2, 3 και 4) και χρόνος κατακράτησης 18 ± 3 λεπτών για το εσωτερικό πρότυπο αραχιδικό λαυρύλιο. Η αντιπροσωπευτικότερη κορυφή των κηρών πρέπει να υπερβαίνει το 60 % της τιμής της πλήρους κλίμακας, ενώ η κορυφή του δεκαεπτανικού μεθυλίου, εσωτερικού προτύπου για τους μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες, πρέπει να φθάνει την τιμή της πλήρους κλίμακας.

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

5.3. Εκτέλεση της ανάλυσης

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

Καταγράφονται οι ενδείξεις του οργάνου μέχρι την πλήρη έκλυση των κηρών ή των στιγμασταδιενίων, ανάλογα με το κλάσμα που υποβάλλεται σε ανάλυση.

Η γραμμή βάσης πρέπει πάντοτε να ανταποκρίνεται στους απαιτούμενους όρους.

5.4. Ταυτοποίηση των κορυφών

Ταυτοποιούνται οι διάφορες κορυφές βάσει των χρόνων κατακράτησης, με σύγκριση με μείγματα κηρών γνωστών χρόνων κατακράτησης τα οποία υποβλήθηκαν σε ανάλυση στις ίδιες συνθήκες. Οι αλκυλεστέρες ταυτοποιούνται με τη βοήθεια μειγμάτων μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων των κυριότερων λιπαρών οξέων του ελαιολάδου (παλμιτικό και ελαϊκό οξύ).

Στο σχήμα 1 εμφανίζεται χρωματογράφημα των κηρών παρθένου ελαιολάδου. Στα σχήματα 2 και 3 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα δύο εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων του λιανικού εμπορίου, από τα οποία το ένα περιέχει μεθυλεστέρες και αιθυλεστέρες και το άλλο όχι. Στο σχήμα 4 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα ενός εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου κορυφαίας ποιότητας και του ίδιου ελαιολάδου μετά από επιβάρυνση με 20 % αποσμημένου ελαίου.

5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός των κηρών

Υπολογίζονται με τη βοήθεια του ολοκληρωτή τα εμβαδά των κορυφών που αντιστοιχούν στο εσωτερικό πρότυπο αραχιδικό λαυρύλιο και στους αλειφατικούς εστέρες με αριθμό ατόμων άνθρακα C₄₀ έως C₄₆.

Υπολογίζεται η συνολική περιεκτικότητα σε κηρούς, σε mg/kg λίπους, με πρόσθεση των επιμέρους κηρών ως εξής:

$$\text{Κηροί, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ **M23**

όπου:

A_x = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί σε κάθε εστέρα, σε μονάδες υπολογιστή,

A_s = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο αραχιδικό λαυρύλιο, σε μονάδες υπολογιστή,

m_s = η προστιθέμενη μάζα αραχιδικού λαυρυλίου ως εσωτερικού προτύπου, σε χιλιοστόγραμμα,

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

5.5.1. Ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων

Υπολογίζονται με τη βοήθεια του ολοκληρωτή τα εμβαδά των κορυφών που αντιστοιχούν στο εσωτερικό πρότυπο δεκαεπτανικό μεθύλιο, στους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων με αριθμό ατόμων άνθρακα C_{16} και C_{18} και στους αιθυλεστέρες των οξέων αυτών.

Υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε καθέναν από τους αλκυλεστέρες, σε mg/kg λίπους, ως εξής:

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

όπου:

A_x = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί σε κάθε εστέρα C_{16} και C_{18} , σε μονάδες υπολογιστή,

A_s = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο δεκαεπτανικό μεθύλιο, σε μονάδες υπολογιστή,

m_s = η προστιθέμενη μάζα δεκαεπτανικού μεθυλίου ως εσωτερικού προτύπου, σε χιλιοστόγραμμα,

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

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αναφέρεται η συνολική περιεκτικότητα στους διάφορους κηρούς C_{40} έως C_{46} (σημείωση 7), σε mg/kg λίπους.

Αναφέρεται η συνολική περιεκτικότητα σε μεθυλεστέρες C_{16} έως C_{18} και αιθυλεστέρες C_{16} έως C_{18} και το άθροισμα των δύο.

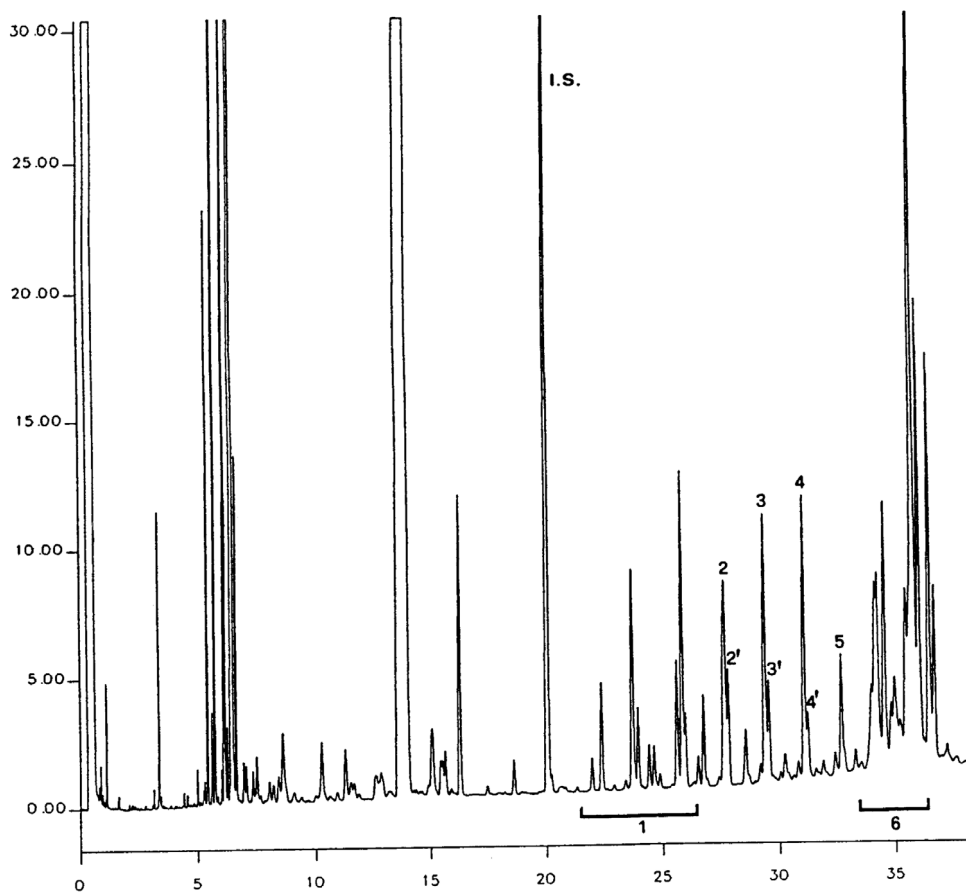
Τα αποτελέσματα θα πρέπει να εκφράζονται στο πλησιέστερο mg/kg.

Σημείωση 7: Τα συστατικά που προσδιορίζονται ποσοτικά αναφέρονται στις κορυφές που αντιστοιχούν σε εστέρες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα μεταξύ C_{40} και C_{46} , κατά το παράδειγμα του χρωματογραφήματος κηρών ελαιολάδου που παρατίθεται στο κατωτέρω σχήμα. Για την ταυτοποίηση, σε περίπτωση διαίρεσης της κορυφής του εστέρα C_{46} , συνιστάται η ανάλυση του κλάσματος κηρών πυρηνελαίου, όπου η κορυφή C_{46} είναι διακριτή επειδή υπερισχύει εμφανώς.

Αναφέρεται η αναλογία μεταξύ των αιθυλεστέρων και των μεθυλεστέρων.

▼ M23

Σχήμα 1

Παράδειγμα χρωματογραφήματος του κλάσματος κηρών ελαιολάδου ⁽¹⁾

Κορυφές των μεθυλεστέρων και αιθυλεστέρων λιπαρών οξέων με χρόνο κατακράτησης 5 έως 8 λεπτών

Υπόμνημα:

I.S. = Αραχιδικό λαυρύλιο

1 = Διτερπενικοί εστέρες

2+2' = Εστέρες C₄₀

3+3' = Εστέρες C₄₂

4+4' = Εστέρες C₄₄

5 = Εστέρες C₄₆

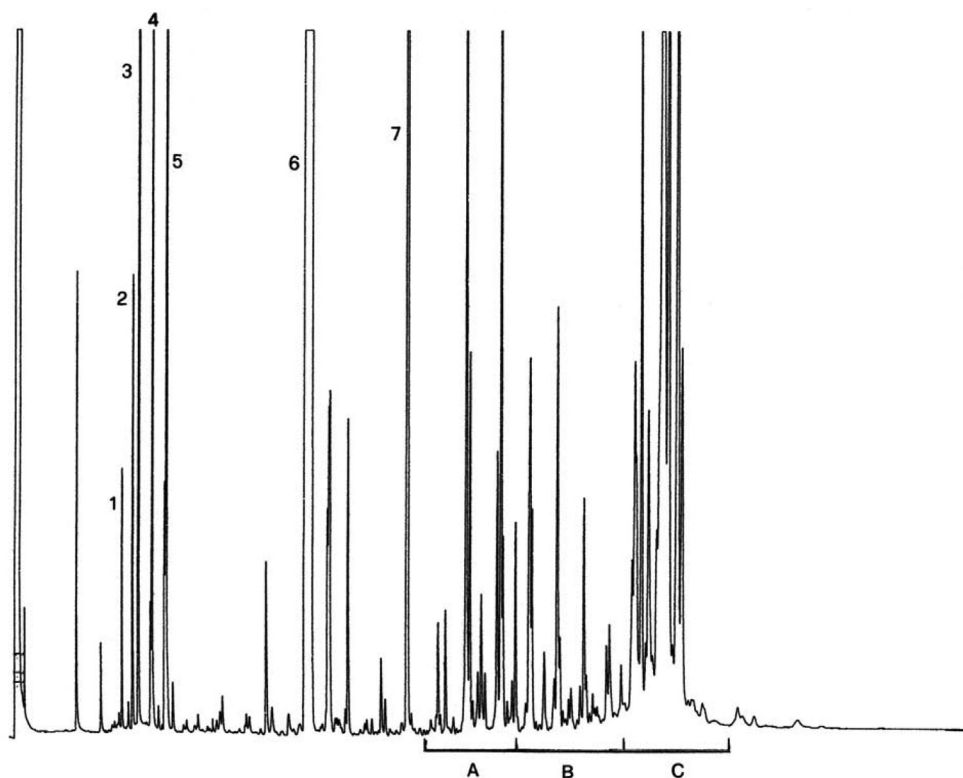
6 = Εστέρες στερολών και τριτερπενικές αλκοόλες

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

▼ **M23**

Σχήμα 2

Μεθυλεστέρες, αιθυλεστέρες και κηροί παρθένου ελαιολάδου



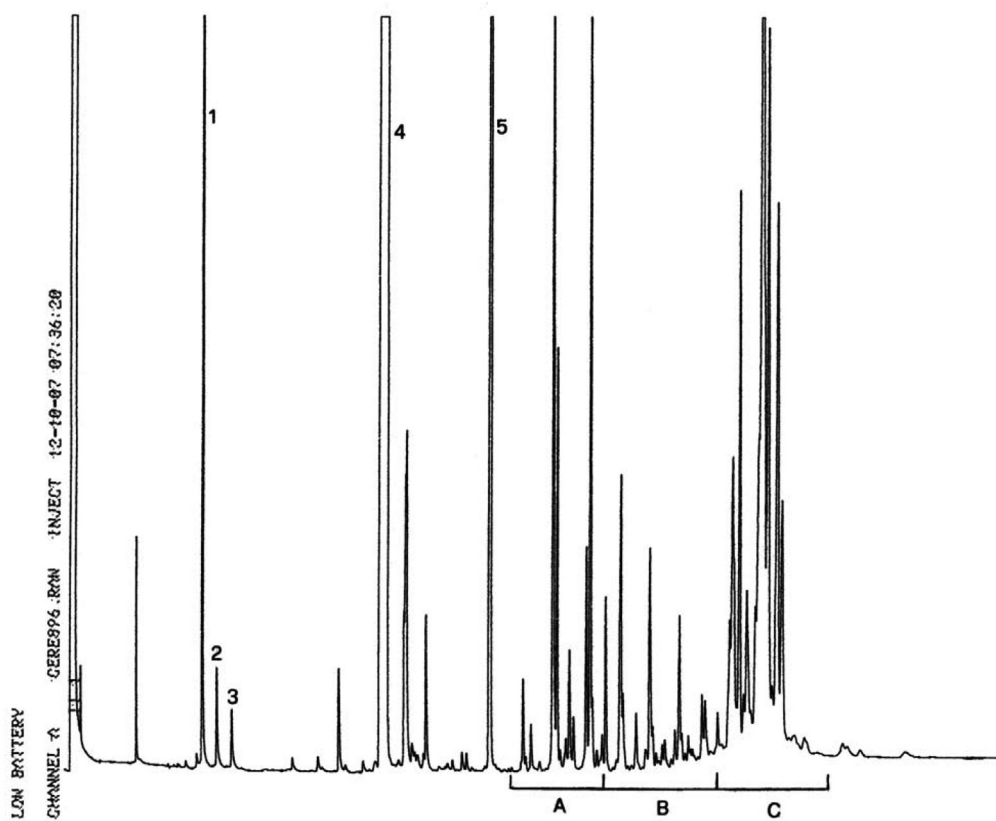
Υπόμνημα:

- 1 – Μεθυλεστέρας C₁₆
- 2 – Αιθυλεστέρας C₁₆
- 3 – Δεκαεπτανικό μεθύλιο (εσωτ. πρότυπο)
- 4 – Μεθυλεστέρας C₁₈
- 5 – Αιθυλεστέρας C₁₈
- 6 – Σκουαλένιο
- 7 – Αραχιδικό λαυρύλιο (εσωτ. πρότυπο)
- A – Διτερπενικοί εστέρες
- B – Κηροί
- C – Εστέρες στερολών και τριτερπενίων

▼ M23

Σχήμα 3

Μεθυλεστέρες, αιθυλεστέρες και κηροί εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου



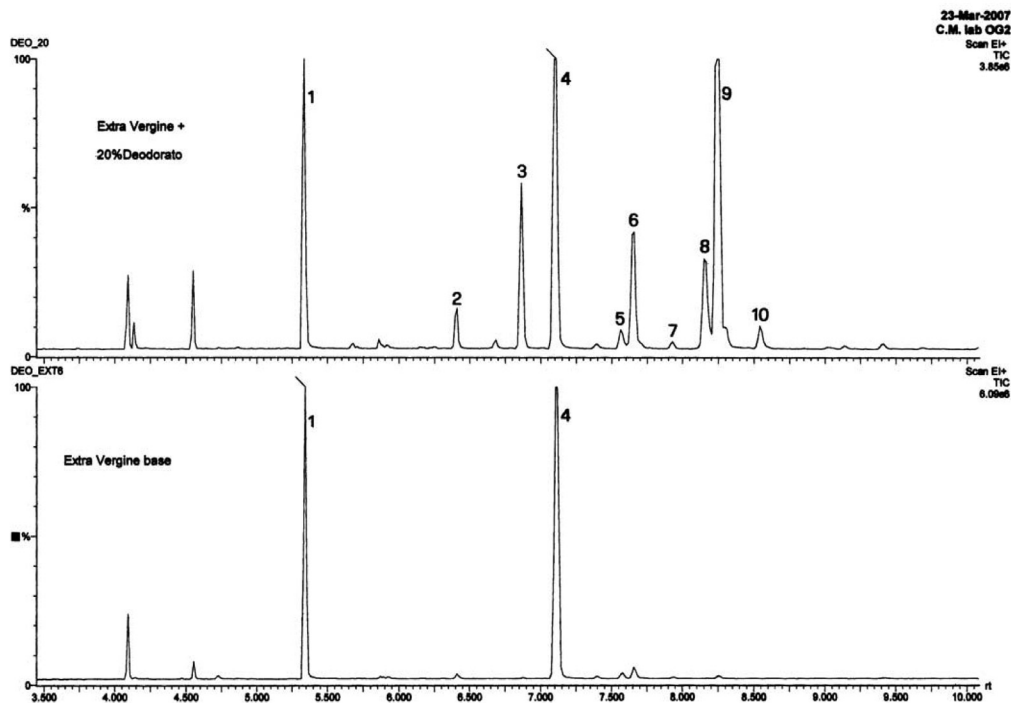
Υπόμνημα:

- 1 – Δεκαεπτανικό μεθύλιο (εσωτ. πρότυπο)
- 2 – Μεθυλεστέρας C₁₈
- 3 – Αιθυλεστέρας C₁₈
- 4 – Σκουαλένιο
- 5 – Αραχιδικό λαυρύλιο (εσωτ. πρότυπο)
- A – Διτερπενικοί εστέρες
- B – Κηροί
- C – Εστέρες στερολών και τριτερπενίων

▼ M23

Σχήμα 4

Τμήμα χρωματογραφήματος ενός εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου και του ίδιου ελαιολάδου μετά από επιβάρυνση με αποσμημένο έλαιο



Υπόμνημα:

- 1 – Μυριστικό μεθύλιο (εσωτ. πρότυπο)
- 2 – Παλμιτικό μεθύλιο
- 3 – Παλμιτικό αιθύλιο
- 4 – Δεκαεπτανικό μεθύλιο (εσωτ. πρότυπο)
- 5 – Λινελαϊκό μεθύλιο
- 6 – Ελαϊκό μεθύλιο
- 7 – Στεατικό μεθύλιο
- 8 – Λινελαϊκό αιθύλιο
- 9 – Ελαϊκό αιθύλιο
- 10 – Στεατικό αιθύλιο

▼ M23*Προσάρτημα Α***Προσδιορισμός της γραμμικής ταχύτητας αερίου**

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

Η γραμμική ταχύτητα, σε cm/s, δίδεται από τη σχέση L/tM , όπου L το μήκος της στήλης, σε εκατοστόμετρα, και tM ο χρόνος, σε δευτερόλεπτα.

▼ M28

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XXI

Αποτελέσματα των αναφερόμενων στο άρθρο 8 παράγραφος 2 ελέγχων συμμόρφωσης για τα ελαιόλαδα

				Επίσημανση						Χημικές παράμετροι			Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ⁽⁴⁾			Τελικό πόρισμα	
Δείγμα	Κατηγορία	Χώρα καταγωγής	Τόπος ελέγχου ⁽¹⁾	Επωνυμία	Ονομασία προέλευσης	Συνθήκες αποθήκευσης	Ανακριβείς πληροφορίες	Ευανάγνωστη	C/NC ⁽²⁾	Παράμετροι εκτός ορίων Ναι/Όχι	Εάν ναι, προσδιορίζονται αυτές οι παράμετροι ⁽²⁾	C/NC ⁽²⁾	Διάμεσος-ελαττωμάτων	Διάμεσος-φρουτώδους	C/NC ⁽²⁾	Απαιτούμενη ενέργεια	Κύρωση

⁽¹⁾ εσωτερική αγορά (ελαιοτριβεία, εμφιαλωτές, έμποροι λιανικής), εξαγωγές, εισαγωγές

⁽²⁾ Κάθε χαρακτηριστικό του ελαιολάδου κατά το παράρτημα I φέρει κωδικό.

⁽³⁾ Συμμόρφωση/Μη συμμόρφωση

⁽⁴⁾ Δεν απαιτείται για το ελαιόλαδο και το πυρηγέλιο.