377R1058

Ἀριθ. N 128/6 Ἐπίσημη Ἐφημερίδα τῶν Εὐρωπαϊκῶν Κοινοτήτων 24.5.77

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) ἀριθ. 1058/77 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

τῆς 18ης Μαΐου 1977

περί τῶν χαρακτηριστικῶν τῶν ἐλαιολάδων καί ὁρισμένων προϊόντων πού περιέχουν ἐλαιόλαδο καί περί τροποποιήσεως τῆς ὀνοματολογίας τοῦ κοινοῦ δασμολογίου σέ ὅ,τι ἀφορᾶ τό ἐλαιόλαδο

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Ἔχοντας ὑπόψη:

τή συνθήκη περί ἱδρύσεως τῆς Εὐρωπαϊκῆς Οἰκονομικῆς Κοινότητος,

τόν κανονισμό ἀριθ. 136/66/ΕΟΚ τοῦ Συμβουλίου τῆς 22ας Σεπτεμβρίου 1966 περί δημιουργίας κοινῆς ὀργανώσεως ἀγορᾶς στόν τομέα τῶν λιπαρῶν οὐσιῶν(1) ὅπως τροποποιήθηκε τελευταῖα ἀπό τόν κανονισμό (ΕΟΚ) ἀριθ. 1707/73(2), καί ἰδίως τά ἄρθρα 13 παράγραφος 4 καί 18 παράγραφος 3,

τόν κανονισμό ἀριθ. 162/66/ΕΟΚ τοῦ Συμβουλίου τῆς 27ης Ὀκτωβρίου 1966 περί τῶν συναλλαγῶν λιπαρῶν οὐσιῶν μεταξύ τῆς Κοινότητος καί τῆς Ἑλλάδος(3), καί ἰδίως τά ἄρθρα 3 παράγραφοι 4 καί 9,

τόν κανονισμό (ΕΟΚ) ἀριθ. 443/72 τοῦ Συμβουλίου τῆς 29ης Φεβρουαρίου 1972 περί τῶν εἰσφορῶν πού ἐφαρμόζονται στό ἐλαιόλαδο πού ἔχει ὑποβληθεῖ σέ διαδικασία ἐξευγενισμοῦ καθώς καί σέ ὁρισμένα προϊόντα πού περιέχουν ἐλαιόλαδο(4), καί ἰδίως τό ἄρθρο 8,

Ἐκτιμώντας:

ὅτι, ἐπί τοῦ παρόντος, ὅλα τά παρθένα ἐλαιόλαδα ἐμπίπτουν στή διάκριση 15.07 Α ΙΙ α) τοῦ κοινοῦ δασμολογίου· ὅτι, ἐκ τοῦ γεγονότος αὐτοῦ, μία καί μόνη εἰσφορά καθορίζεται γιά τά προϊόντα αὐτά· ὅτι, γιά νά δύναται ἡ εἰσφορά κατά τήν εἰσαγωγή νά ἐπιτυγχάνει τό σκοπό της, πρέπει αὐτή νά καθορίζεται ἀνάλογα μέ τούς διαφόρους τύπους παρθένου ἐλαιολάδου καί νά διακριθοῦν, πρός τό σκοπό αὐτό, οἱ τύποι παρθένου ἐλαιολάδου ἀνάλογα μέ τά φυσικά καί χημικά χαρακτηριστικά τους· ὅτι πρέπει ὡς ἐκ τούτου νά προσαρμοσθεῖ ἡ ὀνοματολογία τοῦ κοινοῦ δασμολογίου·

ὅτι ἡ δασμολογική ὀνοματολογία πού προκύπτει ἀπό τήν ἐφαρμογή τοῦ κανονισμοῦ ἀριθ. 136/66/ΕΟΚ ἐνσωματώνεται στό κοινό δασμολόγιο τό ὁποῖο προσαρτᾶται στόν κανονισμό (ΕΟΚ) ἀριθ. 950/68(5), ὅπως τροποποιήθηκε τελευταῖα ἀπό τόν κανονισμό (ΕΟΚ) ἀριθ. 874/77(6)·

ὅτι γιά νά ἐξασφαλισθεῖ ἡ ὀρθή λειτουργία τοῦ συστήματος τῶν εἰσφορῶν οἱ ὁποῖες ἐφαρμόζονται κατά τήν εἰσαγωγή ἐλαιοπυρήνων πρέπει νά προβλεφθεῖ μία ἐνιαία μέθοδος, γιά τόν προσδιορισμό τῆς περιεκτικότητος σέ ἔλαιο τῶν ἐν λόγω προϊόντων·

ὅτι ὁ κανονισμός (ΕΟΚ) ἀριθ. 618/72 τῆς Ἐπιτροπῆς τῆς 29ης Μαρτίου 1972 περί τῶν χαρακτηριστικῶν τῶν ἐλαιολάδων καθώς καί ὁρισμένων προϊόντων πού περιέχουν ἐλαιόλαδο(7), τροποποιήθηκε ἐπανειλημμένως, ἰδίως ἀπό τόν κανονισμό (ΕΟΚ) ἀριθ. 3366/75(8)· ὅτι λαμβανομένων ὑπόψη τῶν νέων τροποποιήσεων πού θά ἐπέλθουν, κρίθηκε σκόπιμο νά καταργηθεῖ αὐτός καί νά ἐνσωματωθεῖ σέ ἕνα νέο κανονισμό τό σύνολο τῶν διατάξεων·

ὅτι τά μέτρα πού προβλέπονται στόν παρόντα κανονισμό εἶναι σύμφωνα μέ τή γνώμη τῆς Ἐπιτροπῆς Διαχειρίσεως Λιπαρῶν Οὐσιῶν,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Ἄρθρο 1

1. Τό μόνο πού θεωρεῖται ὡς ἐλαιόλαδο κατά τήν ἔννοια τῆς διακρίσεως 15.07 Α τοῦ κοινοῦ δασμολογίου, εἶναι τό ἔλαιο, πού προέρχεται ἀποκλειστικά ἀπό τήν ἐπεξεργασία ἐλαιῶν, ἐξαιρέσει τοῦ ἀναεστεροποιημένου ἐλαιολάδου καί κάθε ἄλλου μείγματος ἐλαιολάδου μέ ἔλαιο ἄλλης φύσεως.

Ἡ ἐξακρίβωση τῆς παρουσίας ἀναεστεροποιημένου ἐλαιολάδου ἤ ἄλλης φύσεως ἐλαίων πραγματοποιεῖται μέ τίς μεθόδους πού περιλαμβάνονται ἀντίστοιχα στά παραρτήματα VII καί VIII.

2. Τά ἔλαια, τά ὁποῖα ἔχουν τά χαρακτηριστικά πού ἐμφαίνονται στό παράρτημα I σημεῖα 1, 2 καί 3 κατατάσσονται στίς διακρίσεις 15.07 Α Ι α), 15.07 Α Ι β) καί 15.07 Α Ι γ) τοῦ κοινοῦ δασμολογίου. Γιά τόν προσδιορισμό τῶν ἀνωτέρω ἀναφερομένων χαρακτηριστικῶν χρησιμοποιοῦνται μέθοδοι οἱ ὁποῖες περιγράφονται στά παραρτήματα IV, V καί VI.

3. Τά ἔλαια τά ὁποῖα ἔχουν τά χαρακτηριστικά πού περιλαμβάνονται στό παράρτημα I σημεῖο 4 κατατάσσονται στή διάκριση 15.07 Α ΙΙ α) τοῦ κοινοῦ δασμολογίου.

4. Τά προϊόντα τῆς κλάσεως 15.17 τά ὁποῖα ἔχουν τά χαρακτηριστικά πού ἐμφαίνονται στό παράρτημα ΙΙ

(1) ΕΕ ἀριθ. 172 τῆς 30.9.1966, σ. 3025/66.
(2) ΕΕ ἀριθ. N 175 τῆς 29.6.1973, σ. 5.
(3) ΕΕ ἀριθ. 197 τῆς 29.10.1966, σ. 3393/66.
(4) ΕΕ ἀριθ. N 54 τῆς 3.3.1972, σ. 3.
(5) ΕΕ ἀριθ. N 172 τῆς 22.7.1968, σ. 1.
(6) ΕΕ ἀριθ. N 106 τῆς 29.4.1977, σ. 20.
(7) ΕΕ ἀριθ. N 78 τῆς 31.3.1972, σ. 5.
(8) ΕΕ ἀριθ. N 333 τῆς 30.12.1975, σ. 13.

δέν κατατάσσονται στή διάκριση 15.17 Α τοῦ κοινοῦ δασμολογίου.

Ἄρθρο 2

1. Ἡ περιεκτικότητα σέ ἐλαιόλαδο τῶν ἐλαιοπυρήνων καί τῶν λοιπῶν ὑπολειμμάτων πού ἀπομένουν μετά τή λήψη τοῦ ἐλαιολάδου τά ὁποῖα ὑπάγονται στή διάκριση 23.04 Α προσδιορίζεται σύμφωνα μέ τή μέθοδο πού περιγράφεται στό παράρτημα IX.

2. Ἡ περιεκτικότητα σέ ἐλαιόλαδο, πού ἀναφέρεται στήν παράγραφο 1, ἐκφράζεται μέ τό βάρος του ὑπό μορφή ποσοστοῦ ἐπί τοῖς % ξηρᾶς οὐσίας.

Ἄρθρο 3

Τό κοινό δασμολόγιο τό ὁποῖο προσαρτᾶται στόν κανονισμό (ΕΟΚ) ἀριθ. 950/68 τροποποιεῖται ὡς ἑξῆς:

1. Στή συμπληρωματική σημείωση 1 τοῦ κεφαλαίου 15 οἱ ὅροι «τῆς κλάσεως 15.07» ἀντικαθίστανται ἀπό «τῆς διακρίσεως 15.07 Δ».

2. Οἱ συμπληρωματικές σημειώσεις 2, 3 καί 4 τοῦ κεφαλαίου 15 ἀντικαθίστανται ἀπό τίς συμπληρωματικές σημειώσεις 2, 3 καί 4 πού ἐμφαίνονται στό παράρτημα III τοῦ παρόντος κανονισμοῦ.

3. Ἡ διάκριση 15.07 Α ἀντικαθίσταται ἀπό τό ἀκόλουθο κείμενο:

Δασμολογική κλάση	Περιγραφή ἐμπορευμάτων	Δασμοί	
		Αὐτόνομοι %	Συμβατικοί %
1	2	3	4
15.07	Α. Ἔλαιον ἐλαιῶν:		
	I. Μή ἐπεξεργασμένον:		
	α) Ἔλαιο ἐλαιῶν παρθένον	20 (Ε)	—
	β) Ἔλαιον ἐλαιῶν παρθένον φωτιστικόν	20 (Ε)	—
	γ) Λοιπόν	20 (Ε)	—
	II. Ἕτερον:		
	α) Ληφθέν δι' ἐπεξεργασίας τῶν ἐλαίων τῶν διακρίσεων 15.07 Α I α) ἤ 15.07 Α I β), ἔστω καί μεμιγμένον μέ παρθένον ἐλαιόλαδον	20 (Ε)	—
	β) Μή κατονομαζόμενο	20 (Ε)	—

Ἄρθρο 4

Σέ ὅλες τίς κοινοτικές πράξεις στίς ὁποῖες γίνεται ἀναφορά στίς διακρίσεις 15.07 Α II ἤ 15.07 Α I α) καί β) τοῦ κοινοῦ δασμολογίου, οἱ ἐν λόγω ἀναφορές πρέπει νά θεωροῦνται, ἀναλόγως τῶν χαρακτηριστικῶν τοῦ προϊόντος, ὅτι ἀναφέρονται ἀντίστοιχα στίς διακρίσεις 15.07 Α I α), β) καί γ) καί 15.07 Α II α) καί β) τοῦ κοινοῦ δασμολογίου.

Ἄρθρο 5

Ὁ κανονισμός (ΕΟΚ) ἀριθ. 618/72 τῆς Ἐπιτροπῆς καταργεῖται.

Ἄρθρο 6

Ὁ παρών κανονισμός ἀρχίζει νά ἰσχύει τήν τεσσαρακοστή τρίτη ἡμέρα ἀπό τή δημοσίευσή του στήν *Ἐπίσημη Ἐφημερίδα τῶν Εὐρωπαϊκῶν Κοινοτήτων*.

Ὁ παρών κανονισμός εἶναι δεσμευτικός ὡς πρός ὅλα του τά μέρη καί ἐφαρμόζεται ἄμεσα σέ ὅλα τά Κράτη μέλη.

Ἔγινε στίς Βρυξέλλες, στίς 18 Μαΐου 1977.

Γιά τήν Ἐπιτροπή

Finn GUNDELACH

Ἀντιπρόεδρος

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ

1. Θεωρεῖται ὡς ἔλαιον ἐλαιῶν παρθένον (παρθένο ἐλαιόλαδο), κατά τήν ἔννοια τῆς διακρίσεως 15.07 Α Ι α) τοῦ κοινοῦ δασμολογίου, τό φυσικό ἐλαιόλαδο τό ὁποῖο λαμβάνεται ἀποκλειστικά μέ μηχανικές διαδικασίες, περιλαμβανομένης τῆς πιέσεως, ἐξαιρέσει κάθε ἀναμίξεως μέ ἐλαιόλαδο πού ἀποκτήθηκε κατ' ἄλλο τρόπο καί πού ἔχει τά κατωτέρω χαρακτηριστικά:

   α) περιεκτικότητα σέ ἐλεύθερα λιπαρά ὀξέα, ἐκπεφρασμένα σέ ἐλαϊκό ὀξύ, ὄχι ἀνωτέρα τοῦ 3%·

   β) συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} [ἀπορρόφηση διαλύματος πάχους 1 cm περιέχοντος 1 gr ἐλαίου ἀνά 100 ml, ἐντός ἰσοοκτανίου (2,2,4, τριμεθυλοπεντάνιο) σέ μῆκος κύματος 270 nm] ὄχι ἀνώτερο τοῦ 0,25 καί, κατόπιν ἐπεξεργασίας τοῦ δείγματος ἐλαίου μέ ἐνεργοποιημένη ἀλουμίνα ὄχι ἀνώτερο τοῦ 0,11·

   γ) ἀπόκλιση συντελεστῆ ἀποσβέσεως στήν περιοχή τῶν 270 nm, ὄχι ἀνώτερη τοῦ 0,01.

   'Η ἐν λόγω ἀπόκλιση προσδιορίζεται ἀπό:

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

   ὅπου K_m εἶναι ὁ συντελεστής ἀποσβέσεως στό μῆκος κύματος τοῦ μεγίστου τῆς καμπύλης ἀπορροφήσεως στήν περιοχή τῶν 270 nm καί

   K_{m-4} καί K_{m+4} εἶναι οἱ συντελεστές ἀποσβέσεως σέ μήκη κύματος κατά 4 nm κατώτερα καί ἀνώτερα, ἀντιστοίχως ἀπό αὐτό τοῦ K_m·

   δ) ἀρνητικές ἀντιδράσεις Bellier καί τροποποιημένη Vizern πραγματοποιούμενες μέ τίς μεθόδους πού περιλαμβάνονται στό παράρτημα V ὑπό Α καί Β·

   ε) ἀρνητική δοκιμασία σαπώνων, πραγματοποιούμενη σύμφωνα μέ τή μέθοδο πού περιγράφεται στό Παράρτημα VI.

2. Κατά τήν ἔννοια τῆς διακρίσεως 15.07 Α Ι β) τοῦ κοινοῦ δασμολογίου νοεῖται ὡς ἔλαιον ἐλαιῶν παρθένον φωτιστικόν (παρθένο μειονεκτικό ἐλαιόλαδο λαμπάντε), ὁποιαδήποτε κι ἄν εἶναι ἡ ὀξύτητά του, τό ἐλαιόλαδο πού παρουσιάζει τά ἀκόλουθα χαρακτηριστικά:

   α) συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} ἀνώτερο ἀπό 0,25, καί μετά ἀπό ἐπεξεργασία τοῦ δείγματος μέ ἐνεργοποιημένη ἀλουμίνα, ὄχι ἀνώτερο τοῦ 0,11.

   'Ελαια ἔχοντα περιεκτικότητα ἐλευθέρων λιπαρῶν ὀξέων, ἐκφρασμένη σέ ἐλαϊκό ὀξύ, μεγαλύτερη ἀπό 3% μποροῦν νά ἔχουν, μετά ἀπό διέλευση διά μέσου ἐνεργοποιημένης ἀλουμίνας, συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} ἀνώτερο ἀπό 0,11. Στήν περίπτωση αὐτή, μετά ἀπό ἐξουδετέρωση καί ἀποχρωματισμό στό ἐργαστήριο μέ τή μέθοδο πού καθορίζεται στό Παράρτημα IV, πρέπει νά ἔχουν τά ἀκόλουθα χαρακτηριστικά:

   — συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} ὄχι ἀνώτερο τοῦ 1,10,

   — ἀπόκλιση συντελεστῆ ἀποσβέσεως, σέ περιοχή 270 nm, ἀνώτερη ἀπό 0,01 ὄχι ὅμως ἀνώτερη ἀπό 0,16·

   β) ἀντιδράσεις Bellier καί τροποποιημένη Vizern ἀρνητικές, πραγματοποιούμενες μέ τίς μεθόδους πού ἀναφέρονται στό Παράρτημα V ὑπό Α καί Β·

   γ) ἀναζήτηση σαπώνων ἀρνητική, πραγματοποιούμενη σύμφωνα μέ τή μέθοδο πού περιγράφεται στό παράρτημα VI.

3. Θεωροῦνται ὡς ὑπαγόμενα στή διάκριση 15.07 Α Ι γ) τοῦ κοινοῦ δασμολογίου ἰδίως τά ἔλαια ἀπό «ἐλαιοπυρῆνες», πού ἐμφανίζουν τά ἀκόλουθα χαρακτηριστικά:

   α) περιεκτικότητα σέ ἐλεύθερα λιπαρά ὀξέα, ἐκφραζόμενη σέ ἐλαϊκό ὀξύ, ἀνώτερη ἀπό 3%·

   β) ἀντιδράσεις Bellier καί τροποποιημένη Vizern θετικές, πραγματοποιούμενες μέ τίς μεθόδους πού περιγράφονται στό Παράρτημα V ὑπό Α καί Β·

   γ) ἀναζήτηση σαπώνων ἀρνητική, πραγματοποιούμενη μέ τή μέθοδο πού περιλαμβάνεται στό παράρτημα VI.

4. Θεωρεῖται ὡς ὑπαγόμενο στή διάκριση 15.07 Α ΙΙ α) τοῦ κοινοῦ δασμολογίου τό ἐλαιόλαδο πού λαμβάνεται μετά ἀπό ἐπεξεργασία τῶν ἐλαιολάδων τῶν διακρίσεων 15.07 Α Ι α) ἤ 15.07 Α Ι β), ἔστω καί μεμιγμένο μέ παρθένο ἐλαιόλαδο, καί πού ἔχει τά ἀκόλουθα χαρακτηριστικά:

   α) περιεκτικότητα σέ ἐλεύθερα λιπαρά ὀξέα, ἐκπεφρασμένη σέ ἐλαϊκό ὀξύ, μή ὑπερβαίνουσα τό 3 %·

   β) ἀναζήτηση σαπώνων θετική, πραγματοποιούμενη μέ τή μέθοδο πού περιγράφεται στό Παράρτημα VI,

γ) ἀπόκλιση συντελεστῆ ἀποσβέσεως στήν περιοχή τῶν 270 μή ὑπερβαίνουσα τό 0,01.

Αὐτή ἡ ἀπόκλιση ὁρίζεται ἀπό:

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

ὅπου K_m εἶναι ὁ συντελεστής ἀποσβέσεως στό μῆκος κύματος τοῦ μεγίστου τῆς καμπύλης ἀπορροφήσεως στήν περιοχή 270 nm καί

K_{m-4} καί K_{m+4} εἶναι οἱ συντελεστές ἀποσβέσεως στό μῆκος κύματος κατά 4 nm κατώτερο καί ἀνώτερο, ἀντιστοίχως, ἀπό ἐκεῖνο τοῦ K_m·

δ) ἀρνητικές ἀντιδράσεις Bellier καί τροποποιημένη Vizern·

ε) ἀρνητικό τέστ σαπώνων.

II. Θεωρεῖται ὡς ἔλαιον ἐλαιῶν φωτιστικόν (παρθένο μειονεκτικό ἐλαιόλαδο (λαμπάντε), κατά τήν ἔννοια τῆς διακρίσεως 15.07 A I θ)), ἀνεξαρτήτως ὀξύτητος, τό ἐλαιόλαδο πού ἔχει τά παρακάτω χαρακτηριστικά:

α) συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} ἀνώτερο τοῦ 0,25 καί, μετά ἀπό ἐπεξεργασία τοῦ δείγματος μέ ἐνεργό ἀλουμίνα, ὄχι ἀνώτερο τοῦ 0,11. Ἔλαια πού ἔχουν περιεκτικότητα σέ ἐλεύθερα λιπαρά ὀξέα, ἐκφρασμένη σέ ἐλαϊκό ὀξύ ἀνωτέρα τοῦ 3 %, δύνανται νά ἔχουν, μετά ἀπό διέλευση διά μέσου ἐνεργοποιημένης ἀλουμίνας, συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} ἀνώτερο τοῦ 0,11. Στήν περίπτωση αὐτή, μετά ἀπό ἐξουδετέρωση καί ἀποχρωματισμό στό ἐργαστήριο, πρέπει νά ἔχουν τά παρακάτω χαρακτηριστικά:

— συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} ὄχι ἀνώτερο ἀπό 1,10.

— ἀπόκλιση συντελεστῆ ἀποσβέσεως στήν περιοχή 270 nm, ἀνωτέρα τοῦ 0,01, ἀλλά ὄχι πέραν τοῦ 0,16·

θ) ἀρνητικές ἀντιδράσεις Bellier καί τροποποιημένη Vizern·

γ) ἀρνητικό τέστ σαπώνων.

III. Θεωροῦνται ὡς προϊόντα ὑπαγόμενα στή διάκριση 15.07 A I γ) τά ἔλαια, ἰδίως τά ἔλαια «ἐλαιοπυρήνων», πού ἐμφανίζουν τά κατωτέρω χαρακτηριστικά:

α) περιεκτικότητα σέ ἐλεύθερα λιπαρά ὀξέα, ἐκφρασμένη σέ ἐλαϊκό ὀξύ, ἀνωτέρα τοῦ 3 %·

θ) θετική ἀντίδραση Bellier καί/ἤ τροποποιημένη Vizern·

γ) ἀρνητικά τέστ σαπώνων.

Γ. Ὑπάγεται στή διάκριση 15.07 A II α) τό ἐλαιόλαδο, τό λαμβανόμενο μετά ἀπό ἐπεξεργασία τῶν ἐλαίων τῶν διακρίσεων 15.07 A I α) καί/ἤ 15.07 A I θ), ἔστω καί μεμιγμένο μέ παρθένο ἐλαιόλαδο, πού ἔχει τά κατωτέρω χαρακτηριστικά:

α) περιεκτικότητα σέ ἐλεύθερα λιπαρά ὀξέα, ἐκπεφρασμένη σέ ἐλαϊκό ὀξύ, μή ὑπερβαίνουσα τό 3 %·

θ) — θετικό τέστ σαπώνων ἤ συντελεστή ἀποσβέσεως, K_{270} ἀνώτερο τοῦ 0,25, ἀλλά ὄχι ἀνώτερο τοῦ 1,10 καί, μετά ἀπό ἐπεξεργασία τοῦ δείγματος ἐλαιολάδου μέ ἐνεργοποιημένη ἀλουμίνα, ἀνώτερο τοῦ 0,11 καί

— ἀπόκλιση συντελεστῆ ἀποσβέσεως, στήν περιοχή 270 nm, ἀνωτέρα τοῦ 0,01 ἀλλά ὄχι πέραν τοῦ 0,16.

Αὐτή ἡ ἀπόκλιση ὁρίζεται ἀπό τόν ἀκόλουθο τύπο:

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

ὅπου K_m = ὁ συντελεστής ἀποσβέσεως στό μῆκος κύματος τοῦ μεγίστου τῆς καμπύλης ἀπορροφήσεως στήν περιοχή τῶν 270 nm καί

K_{m-4} καί K_{m+4} συντελεστές ἀποσβέσεως σέ μῆκος κύματος κατά 4 nm κατώτερο καί ἀνώτερο ἀντιστοίχως, ἀπό ἐκεῖνο τοῦ K_m·

γ) ἀρνητικές ἀντιδράσεις Bellier καί τροποποιημένη Vizern.

— ἡ συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} ἀνώτερο τοῦ 0,25 ὄχι ὅμως ἀνώτερο τοῦ 1,10 καί μετά ἀπό ἐπεξεργασία τοῦ δείγματος τοῦ ἐλαίου μέ ἐνεργοποιημένη ἀλουμίνα, ὑψηλότερο τοῦ 0,11,

καί:

— ἀπόκλιση συντελεστῆ ἀποσβέσεως, σέ περιοχή 270 nm, ἀνώτερη τοῦ 0,01 ὄχι ὅμως ἀνώτερη τοῦ 0,16.

'Η ἀπόκλιση αὐτή προσδιορίζεται ἀπό τόν τύπο:

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

ὅπου K_m εἶναι ὁ συντελεστής ἀποσβέσεως στό μῆκος κύματος τοῦ μεγίστου τῆς καμπύλης ἀπορροφήσεως σέ περιοχή 270 nm

καί K_{m-4} καί K_{m+4} εἶναι οἱ συντελεστές ἀποσβέσεως σέ μῆκος κύματος 4 nm κατά κατώτερο καί ἀνώτερο, ἀντιστοίχως ἐκείνου τοῦ K_m·

γ) ἀντιδράσεις Bellier καί τροποποιημένη Vizern ἀρνητικές, πραγματοποιούμενες μέ τίς μεθόδους πού περιλαμβάνονται στό Παράρτημα V ὑπό Α καί Β.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΥΠΑΓΟΜΕΝΑ ΣΤΗ ΔΙΑΚΡΙΣΗ 15.17 Α

'Αποκλείονται τῆς διακρίσεως 15.17 Α:

α) ὑπολείμματα προερχόμενα ἀπό τήν ἐπεξεργασία λιπαρῶν σωμάτων, πού περιέχουν ἔλαιο τοῦ ὁποίου ὁ δείκτης ἰωδίου προσδιοριζόμενος μέ τή μέθοδο Wijs χωρίς καταλύτη, εἶναι κατώτερος τοῦ 70 ἤ ἀνώτερος τοῦ 100·

β) ὑπολείμματα, προερχόμενα ἀπό τήν ἐπεξεργασία λιπαρῶν σωμάτων, περιέχοντα ἔλαιο τοῦ ὁποίου ὁ δείκτης ἰωδίου περιλαμβάνεται μεταξύ 70 καί 100, ἀλλά τοῦ ὁποίου ἡ ἐπιφάνεια τῆς καμπύλης (PIC) πού ἀντιστοιχεῖ στήν β-σιτοστερόλη, προσδιοριζόμενη σύμφωνα μέ τίς διατάξεις τοῦ Παραρτήματος VIII, ἀντιπροσωπεύει ὀλιγώτερο ἀπό τό 93 % τῆς συνολικῆς ἐπιφανείας τῶν καμπυλῶν τῶν στερολῶν.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ 2, 3 ΚΑΙ 4 ΤΟΥ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 15 ΤΟΥ ΚΟΙΝΟΥ ΔΑΣΜΟΛΟΓΙΟΥ

2. Α. Τό μόνο πού θεωρεῖται ὡς ἐλαιόλαδο κατά τήν ἔννοια τῆς διακρίσεως 15.07 Α εἶναι τό «ἔλαιο» πού προέρχεται ἀποκλειστικά ἀπό τήν ἐπεξεργασία ἐλαιῶν, ἀποκλειομένου τοῦ ἀναεστεροποιημένου ἐλαιολάδου, καί κάθε μίγματος ἐλαιολάδου μέ ἔλαια ἄλλης φύσεως.

Β. Θεωροῦνται ὡς μή ἐπεξεργασμένα ἐλαιόλαδα, τά ἔλαια τά προσδιοριζόμενα στά σημεῖα I, II καί III ὡς κάτωθι:

I. Τό μόνο πού θεωρεῖται ὡς παρθένο ἐλαιόλαδο, κατά τήν ἔννοια τῆς διακρίσεως 15.07 Α I α), εἶναι τό φυσικό ἐλαιόλαδο, πού λαμβάνεται ἀποκλειστικά μέ μηχανική ἐπεξεργασία, συμπεριλαμβανομένης τῆς πιέσεως, ἐξαιρέσει κάθε μίγματος μέ ἐλαιόλαδο λαμβανόμενο διαφορετικά, καί πού παρουσιάζει τά κατωτέρω χαρακτηριστικά:

α) περιεκτικότητα σέ ἐλεύθερα λιπαρά ὀξέα, ἐκφρασμένη σέ ἐλαϊκό ὀξύ ὄχι μεγαλύτερη ἀπό 3 %·

β) συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} [ἀπορρόφηση διαλύματος πάχους 1 ἑκατοστοῦ, περιέχοντος 1 γραμμάριο ἐλαιολάδου ἀνά 100 χιλιοστόλιτρα, ἐντός ἰσο-ὀκτανίου (2,2,4-τριμεθυλοπεντάνιο) σέ μῆκος κύματος 270 nm] ὄχι ἀνώτερο τοῦ 0,25 καί, μετά ἀπό ἐπεξεργασία τοῦ δείγματος ἐλαιολάδου μέ ἐνεργοποιημένη ἀλουμίνα, ὄχι ἀνώτερο τοῦ 0,11·

3. 'Εξαιροῦνται τῆς διακρίσεως 15.17:

α) ὑπολείμματα, προερχόμενα ἀπό τήν ἐπεξεργασία λιπαρῶν σωμάτων περιέχοντα ἔλαιο τοῦ ὁποίου ὁ δείκτης ἰωδίου προσδιοριζόμενος μέ τή μέθοδο Wijs χωρίς καταλύτη, εἶναι κατώτερος ἀπό 70 ἤ ἀνώτερος ἀπό 100·

θ) ὑπολείμματα, προερχόμενα ἀπό τήν ἐπεξεργασία λιπαρῶν σωμάτων, περιέχοντα ἔλαιο τοῦ ὁποίου ὁ δείκτης ἰωδίου περιλαμβάνεται μεταξύ 70 καί 100, τοῦ ὁποίου ὅμως ἡ ἐπιφάνεια τῆς καμπύλης πού ἀντιστοιχεῖ στή θ-σιτοστερόλη, προσδιοριζόμενη σύμφωνα μέ τίς διατάξεις Παραρτήματος VIII τοῦ κανονισμοῦ πού ἀναφέρεται στήν ἀνωτέρω συμπληρωματική σημείωση 4, ἀντιπροσωπεύει ὀλιγώτερο ἀπό τό 93 %, τῆς συνολικῆς ἐπιφανείας τῶν καμπυλῶν τῶν στερολῶν.

4. Οἱ ἀναλυτικές μέθοδοι γιά τόν προσδιορισμό τῶν χαρακτηριστικῶν τῶν προϊόντων πού ἀναφέρονται ἀνωτέρω, εἶναι ἐκεῖνες πού προβλέπονται ἀντίστοιχα στά Παραρτήματα τοῦ κανονισμοῦ (ΕΟΚ) ἀριθ. 1058/77.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

I. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΑΛΟΥΜΙΝΑ

1. Μέσα σέ στήλη χρωματογραφίας διαμέτρου περίπου 35 mm καί μήκους 450 mm ἐφοδιασμένη μέ σωλήνα ἀποχύσεως διαμέτρου 10 mm περίπου, θέτουμε 30 g βασικῆς ἀλουμίνας παρασκευασμένης σύμφωνα μέ τή διαδικασία πού περιγράφεται στήν παράγραφο 2.

Συμπιέζουμε μηχανικά τήν ἀλουμίνα, κτυπώντας τή στήλη ἐλαφρά, ἀρκετές φορές, διατηρώντας την κάθετη, ἐπάνω σέ ξύλινη ἐπιφάνεια. Μέσα στή στήλη παρασκευασμένη μέ τόν ἀνωτέρω τρόπο, εἰσάγουμε 100 ml διαλύματος 10 % ἐλαίου σέ ἑξάνιο.

Συλλέγουμε τό ἔκλουσμα καί ἐξατμίζουμε τό διαλύτη ἐν κενῷ σέ θερμοκρασία κατωτέρα τῶν 25 °C.

'Ο προσδιορισμός τοῦ συντελεστῆ ἀποσβέσεως στά 270 nm πρέπει νά ἐκτελεῖται ἀμέσως στό ἔλαιο πού ἐλήφθη μέ τόν τρόπο αὐτό.

2. 'Η βασική ἀλουμίνα δραστικότητος Brockmann I (0 % ὕδωρ) παρασκευάζεται διά θερμάνσεως, ἐπί τρεῖς ὥρες σέ 380 – 400° C, βασικῆς ἀλουμίνας (χρωματογραφίας), μεγέθους τεμαχίων ἀπό 30 μm μέχρι 130 μm (80 μm κατά μέσο ὅρο). Προκειμένου νά λάβουμε βασική ἀλουμίνα μέ δραστικότητα, Brockmann μεταξύ II καί III προσθέτουμε 5 ml ἀπεσταγμένου ὕδατος σέ 100 g τοῦ προϊόντος αὐτοῦ. 'Αναδεύουμε συχνά καί τό ἀφήνουμε νά παραμείνει ἤρεμο μία νύχτα σέ ἑρμητικά κλεισμένο δοχεῖο.

Δοκιμή δραστικότητος τῆς ἀλουμίνας

Μέσα σέ στήλη χρωματογραφίας διαμέτρου περίπου 35 mm καί μήκους 450 mm, τοποθετοῦμε 30 g βασικῆς ἀλουμίνας (παρασκευή μέ τόν τρόπο πού περιγράφεται ἀνωτέρω). Μίγμα 95 % παρθένου ἐλαιολάδου, μέ συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} ὄχι ἀνώτερο τοῦ 0,18, καί 5 % ἐλαίου ἀραχίδος, ἐπεξεργασμένου κατά τή στιγμή τῆς διυλίσεώς του μέ λευκαντικό πηλό μέ συντελεστή ἀποσβέσεως K_{270} ὄχι κατώτερο τοῦ 4, φέρεται μέσω αὐτῆς τῆς στήλης μέ τίς συνθῆκες πού ὁρίζονται ἀπό τή μέθοδο. 'Εάν τό μίγμα ἔχει συντελεστή ἀποσβέσεως ἀνώτερο τοῦ 0,11, ἡ ἀλουμίνα γίνεται ἀποδεκτή. 'Εάν τά συζυγῆ τριένια παραμένουν ἀνέκλουστα ἀπό τήν ἀλουμίνα, εἶναι ἀναγκαῖο νά χρησιμοποιήσουμε ἀλουμίνα μέ μεγαλύτερο βαθμό ὑδατώσεως, ἀφοῦ ἐπαληθεύσουμε ὅτι ἱκανοποιεῖ τίς ἀπαιτήσεις τοῦ προηγουμένου τέστ.

II. ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Α. ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΥ

1. **'Εξοπλισμός**

— ὑάλινο ποτήρι 300 ml ὑψηλοῦ σχήματος,
— ἐργαστηριακή φυγόκεντρος μέ σωλῆνες τῶν 100 ml,
— ὑάλινο ποτήρι τῶν 250 ml,
— σφαιρικές φιάλες τῶν 100 ml,
— διαχωριστική χοάνη ἑνός λίτρου.

2. **Ἀντιδραστήρια**

— ὑδατικό διάλυμα 12% ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου,
— αἰθανολικό διάλυμα 1 % φαινολοφθαλεΐνης,
— ἑξάνιο καθαρό, p.a,
— ἰσοπροπυλική ἀλκοόλη καθαρή p.a.

3. **Τρόπος ἐργασίας**

α) *Ἔλαια ὀξύτητος ἐκπεφρασμένης σέ ἐλαϊκό ὀξύ μέχρι 30 %.*

Τοποθετοῦμε 50 g ἀκατεργάστου ἐλαίου μέσα σέ ὑψηλό ποτήριο ζέσεως τῶν 300 ml καί θερμαίνουμε σέ ὑδρόλουτρο μέχρι τούς 65 °C. Ἀναδεύοντας ἀργά, προσθέτουμε ποσότητα διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 12 % ἀντιστοιχούσα στήν ἐλεύθερη ὀξύτητα τοῦ ἐλαίου, μέ περίσσεια 5 %. Συνεχίζουμε τήν ἀνάδευση γιά πέντε λεπτά διατηρώντας τή θερμοκρασία στούς 65 °C.

Μεταφέρουμε τό μίγμα στούς δοκιμαστικούς σωλῆνες τῆς φυγοκέντρου, τῶν 100 ml, καί διαχωρίζουμε τό σαπούνι μέ φυγοκέντριση. Ἀποχύνουμε καί μεταγγίζουμε τό ἔλαιο σέ ποτήρι ζέσεως τῶν 250 ml, τό ξεπλένουμε μέ 50 ἕως 60 ml ζέοντος ἀπεσταγμένου ὕδατος, ἀπομακρύνοντας συγχρόνως τή στιβάδα τοῦ ὕδατος μέ σιφώνιο. Ἐπαναλαμβάνουμε τίς ἐκπλύσεις μέχρις ὅτου ἐξαφανισθοῦν τά ἴχνη ὑπολειμμάτων σάπωνος (ἐξαφάνιση τῆς ροδαλῆς χροιᾶς τῆς φαινολοφθαλεΐνης).

Φυγοκεντροῦμε τό ἔλαιο προκειμένου νά ἀπομακρύνουμε τίς ἀπομένουσες μικρές ποσότητες νεροῦ.

β) *Ἔλαια ὀξύτητος ἐκπεφρασμένης σέ ἐλαϊκό ὀξύ ἄνω τοῦ 30 %.*

Ἐντός διαχωριστικῆς χοάνης τοῦ ἑνός λίτρου διαθιβάζουμε 50 g ἀκατεργάστου ἐλαίου, 200 ml ἑξανίου, 100 ml ἰσοπροπυλικῆς ἀλκοόλης καί ποσότητα διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 12 % ἀντιστοιχούσα στήν ἐλεύθερη ὀξύτητα τοῦ ἐλαίου μέ περίσσεια 0,3 %.

Ἀναδεύουμε ἰσχυρά γιά ἕνα λεπτό. Προσθέτουμε 100 ml ἀπεσταγμένου ὕδατος, ἀναταράσσουμε ἐκ νέου καί ἀφήνουμε νά ἠρεμήσει.

Μετά τόν διαχωρισμό τῶν στιβάδων, ἀφήνουμε νά ἐκχυθεῖ ἡ κατώτερη στιβάδα πού περιέχει τούς σάπωνες. Μεταξύ τῶν δύο στιβάδων (ἐλαιώδης πρός τά ἄνω καί ὑδατίνη πρός τά κάτω) δημιουργεῖται συχνά μία ἐνδιάμεση στιβάδα ἀπό μυκηλίωμα καί ἀδιάλυτα συστατικά ἡ ὁποία πρέπει ἐπίσης νά ἀπομακρυνθεῖ.

Β. ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΜΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΥ

1. **Ἐξοπλισμός**

— σφαιρική φιάλη τῶν 250 ml μέ τρεῖς λαιμούς ἐσμυρισμένους γιά τήν τοποθέτηση:

α) θερμομέτρου βαθμολογημένου σέ βαθμούς καί ἐπιτρέποντος τή λήψη ἐνδείξεων μέχρι τούς 90 °C,

β) μηχανικοῦ ἀναδευτήρα πραγματοποιοῦντος 250 ἕως 300 στροφές τό λεπτό, καταλλήλου γιά ἐργασία ἐν κενῷ·

γ) συνδέσεως μέ ἀντλία κενοῦ,

— ἀντλία κενοῦ, ἐφοδιασμένη μέ μανόμετρο, δυναμένη νά δώσει πιέσεις 15 ἕως 30 millibars.

2. **Τρόπος ἐργασίας**

Ζυγίζουμε περίπου 100 g ἐξουδετερωθέντος ἐλαίου ἐντός τῆς τριλαίμου σφαιρικῆς φιάλης. Εἰσάγουμε τό θερμόμετρο καί τόν ἀναδευτήρα, συνδέουμε τήν ἀντλία κενοῦ καί θερμαίνουμε στούς 90 °C ἀναδεύοντας συνεχῶς. Διατηροῦμε τή θερμοκρασία αὐτή, πάντα ὑπό ἀνάδευση, μέχρις ὅτου τό πρός ἀνάλυση ἔλαιο ἀπαλλαγεῖ πλήρως ἀπό τήν ὑγρασία, (περίπου γιά 30 λεπτά). Τότε διακόπτουμε τό κενό καί προσθέτουμε 2 ἕως 3 g ἐνεργοῦ γῆς. Ἀποκαθιστοῦμε τό κενό ἕως ὅτου ἡ παραμένουσα πίεση φθάσει τά 15 ἕως 30 millibars καί, διατηρώντας τή θερμοκρασία στούς 90 °C ἀναδεύουμε ἐπί τριάντα λεπτά μέ 250 στροφές ἀνά λεπτό περίπου.

Ἐν συνεχεία διηθοῦμε ἐν θερμῷ ἐντός κλιβάνου ρυθμιζομένης θερμοκρασίας (50 ἕως 60 °C).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΟΥ ΕΝΤΟΣ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ

Α. ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΛΟΥΜΕΝΗ «BELLIER»

1. **Ἐξοπλισμός**

— σφαιρική φιάλη τῶν 100 ml ἐφοδιασμένη μέ ψυκτικό ἐπαναρροῆς,

— σιφώνιο τῶν 5 ml, βαθμολογημένο σέ δέκατα,

— σύστημα θερμάνσεως μέ τό ὁποῖο νά δύναται νά ἐπιτευχθεῖ θερμοκρασία περίπου 80 °C,

— θερμόμετρο βαθμολογημένο ἀπό 15 ἕως 60 °C.

2. **Ἀντιδραστήρια**

— Διάλυμα ὑδατικό-ἀλκοολικό τοῦ ὑδροξειδίου τοῦ καλίου (42,5 g KOH διαλύονται ἐντός 72 ml ἀπεσταγμένου ὕδατος· ὁ ὄγκος τελικῶς τοῦ διαλύματος γίνεται 500 ml μέ προσθήκη αἰθυλικῆς ἀλκοόλης 95 °),

— διάλυμα αἰθυλικῆς ἀλκοόλης 70°,

— Ὑδατικό διάλυμα ὀξεϊκοῦ ὀξέος, 1 + 2 (κατ' ὄγκο), παρασκευασμένο εἰς τρόπον ὥστε 1,5 ml αὐτοῦ νά ἐξουδετερώνουν ἀκριβῶς 5 ml ἐκ τοῦ ὑδατικοῦ-ἀλκοολικοῦ διαλύματος τοῦ ὑδροξειδίου τοῦ καλίου παρουσία φαινολοφθαλεΐνης.

3. **Παρασκευή τοῦ δείγματος**

Ἀπομακρύνουμε τήν ὑγρασία ἀπό τό ἔλαιο μέ μετάγγιση καί διήθηση μέσω χάρτου, ἐκτελώντας τίς ἐργασίες αὐτές σέ θερμοκρασία λίγο ὑψηλότερη ἀπό τό σημεῖο τήξεως ὁρισμένων στερεῶν συστατικῶν τά ὁποῖα θά κινδύνευαν νά διαχωρισθοῦν ἀπό τή ρευστή λιπαρή οὐσία.

4. **Τρόπος ἐργασίας**

Ἐντός σφαιρικῆς φιάλης τοποθετοῦμε περίπου 1 ml ἐλαίου παρασκευασμένου ὅπως δείχνει ἡ παράγραφος 3. Προσθέτουμε 5 ml ὑδατικοῦ-ἀλκοολικοῦ διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ καλίου. Τοποθετοῦμε τόν ψυκτήρα καί φέρουμε σέ θρασμό ἐπί 10 λεπτά ἀναδεύοντας ἀπό καιροῦ εἰς καιρό. Ἀφήνουμε νά ψυχθεῖ στή θερμοκρασία τοῦ δωματίου. Προσθέτουμε 1,5 ml ὑδατικοῦ διαλύματος ὀξεϊκοῦ ὀξέος καί 50 ml διαλύματος αἰθυλικῆς ἀλκοόλης προηγουμένως θερμανθείσης στούς 50 °C. Ἀναμιγνύουμε μέ ἀνάδευση, εἰσάγουμε τό θερμόμετρο καί ἀφήνουμε νά ψυχθεῖ, παρατηρώντας προσεκτικά τό διάλυμα ὅταν αὐτό πλησιάσει τή θερμοκρασία τῶν 45 °C. Ἂν σχηματισθεῖ ἵζημα φλοκῶδες μέ μορφή νιφάδων σέ θερμοκρασία ὑψηλότερη τῶν 40 °C ἡ ἀντίδραση εἶναι θετική. Ἂν δέν ἐμφανισθεῖ τό χαρακτηριστικό ἵζημα μέ μορφή νιφάδων, διατηροῦμε τό ὑγρό σέ θερμοκρασία δωματίου ἡ ὁποία πρέπει νά εὑρίσκεται μεταξύ 20° καί 22 °C, γιά 24 ὧρες τουλάχιστο ἤ ἐάν εἶναι ἀπαραίτητο γιά 48 ὧρες. Παρατηροῦμε ἐκ νέου τό διάλυμα: ὁ σχηματισμός ἱζήματος μέ μορφή νιφάδων ἐν αἰωρήσει ἐντός τοῦ ὑγροῦ ἀποδεικνύει ἐπίσης ὅτι ἡ ἀντίδραση εἶναι θετική.

Ἔκφραση τῶν ἀποτελεσμάτων

Ἀναζήτηση τῆς παρουσίας πυρηνελαίου (μέθοδος Bellier) θετική ἤ ἀρνητική.

Β. ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΛΟΥΜΕΝΗ «ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ VIZERN»

Τά ἀσαπωνοποίητα συστατικά τοῦ πρός ἀνάλυση ἐλαίου ἀπομονώνονται καί ἐξετάζεται ἡ συμπεριφορά τους μέσα σέ ἀλκοόλη 85° κάτω ἀπό ὁρισμένες συνθῆκες.

1. **Συσκευές**

— ὑάλινη σφαιρική φιάλη τῶν 300 ml ἀνθεκτική στά ἀλκάλια καί ἐφοδιασμένη μέ ψυκτήρα ἐπαναρροῆς,

— διαχωριστικές χοάνες τῶν 500 ml ἤ 1000 ml,

— ποτήρια ζέσεως τῶν 300 ml καί 250 ml,

— ὑάλινοι δοκιμαστικοί σωλῆνες.

2. **'Αντιδραστήρια**

— ἀλκοολικό διάλυμα ὑδροξειδίου τοῦ καλίου 2 N,
— πετρελαϊκός αἰθήρ,
— αἰθυλική ἀλκοόλη 50 %,
— αἰθυλική ἀλκοόλη 96°, ταυτοποιημένη δι' ἀλκοολομέτρου,
— ὑπεροξείδιο τοῦ ὑδρογόνου 10 ὄγκων,
— αἰθυλική ἀλκοόλη 85°, ταυτοποιημένη δι' ἀλκοολομέτρου.

3. **Τρόπος ἐργασίας**

'Εντός σφαιρικῆς φιάλης τῶν 300 ml ζυγίζουμε περίπου 5 g ἀπό τό πρός ἀνάλυση δεῖγμα. Προσθέτουμε 50 ml ἀλκοολικοῦ διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ καλίου 2 N. Τοποθετοῦμε τόν ψυκτήρα καί φέρομε σέ ἤπιο θρασμό. Μετά θέρμανση μιᾶς ὥρας, ἀναδεύουμε καί ψύχουμε στούς 30 ° ἕως 35 °C. Μεταφέρουμε τό περιεχόμενο τῆς φιάλης ἐντός διαχωριστικῆς χοάνης, χρησιμοποιώντας 50 ml ἀπεσταγμένου ὕδατος.

Ξεπλένουμε τή φιάλη προσεκτικά μέ 50 ml πετρελαϊκοῦ αἰθέρος ἐπαναλαμβάνοντας τήν ἐργασία ἀρκετές φορές. Μεταφέρουμε τόν πετρελαϊκό αἰθέρα ἐντός διαχωριστικῆς χοάνης. 'Ανακινοῦμε ἰσχυρῶς τό περιεχόμενο γιά περισσότερο ἀπό ἕνα λεπτό. Μετά τό διαχωρισμό μεταφέρουμε τήν ὑδατίνη στιβάδα ἐντός δευτέρας διαχωριστικῆς χοάνης. Προσθέτουμε ἄλλα 50 ml πετρελαϊκοῦ αἰθέρος, ἀνακινοῦμε τό περιεχόμενο ἰσχυρῶς γιά περισσότερο ἀπό ἕνα λεπτό καί ἀκολουθεῖ ὁ διαχωρισμός. Μεταφέρουμε πάλι τήν ὑδατίνη στιβάδα σέ τρίτη διαχωριστική χοάνη, προσθέτουμε 50 ml πετρελαϊκοῦ αἰθέρος. 'Ανακινοῦμε ἰσχυρῶς καί ἀκολουθεῖ διαχωρισμός.

Συλλέγουμε ἐντός διαχωριστικῆς χοάνης τά αἰθερικά ἐκχυλίσματα τά προερχόμενα ἀπό τίς ἐκχυλίσεις τῶν ἀσαπωνοποίητων συστατικῶν καί τά ξεπλένουμε τουλάχιστον τρεῖς φορές μέ διάλυμα ἀλκοόλης 50 % (50 ml κάθε φορά) ἕως ὅτου τά ὑγρά τῶν ἐκπλύσεων δέν δίδουν ἀλκαλική ἀντίδραση φαινολοφθαλεΐνης.

Διηθοῦμε τό διάλυμα τῶν ἀσαπωνοποιήτων συστατικῶν μέσα σέ ποτήρι ζέσεως τῶν 300 ml, ξεπλένουμε τόν ἠθμό μέ πετρελαϊκό αἰθέρα καί ἀπομακρύνουμε τό διαλύτη δι' ἀποστάξεως. Προσθέτουμε 10 ml ἀλκοόλης 96° καί μετά ἀπό μέτρια θέρμανση (περίπου στούς 40 °C), διηθοῦμε ἐντός ποτηρίου τῶν 100 ml. Ξεπλένουμε τό ποτήρι τῶν 300 ml μέ 10 ml ἀλκοόλης 96° καί ἐν συνεχεία διηθοῦμε ἐντός τοῦ δευτέρου ποτηρίου.
'Εντός τοῦ ποτηρίου τῶν 100 ml περιέχοντος τά ἀλκοολικά ἐκχυλίσματα τῶν ἀσαπωνοποιήτων συστατικῶν, προσθέτουμε 5 ml ὑπεροξειδίου τοῦ ὑδρογόνου τῶν 10 ὄγκων, θερμαίνουμε ἐντός ὑδρολούτρου μέχρι πλήρους ἐξατμίσεως. Προσθέτουμε ἄλλα 20 ml ἀλκοόλης 96° καί 5 ml ὑπεροξειδίου τοῦ ὑδρογόνου· ἀφήνουμε ἐκ νέου νά ἐξατμισθοῦν πλήρως.

'Απομακρύνουμε τό ποτήρι ἀπό τό ὑδρόλουτρο καί προσθέτουμε 20 ml ἀλκοόλης 85°. Θερμαίνουμε ἐλαφρῶς σέ ὑδρόλουτρο, ἐνεργώντας πολύ προσεκτικά γιά νά μήν προκαλέσουμε ἀπώλειες τῆς ἀλκοόλης καί μειώσουμε ἔτσι τή συγκέντρωση. Πρόκειται γιά ἕνα στοιχεῖο πολύ σημαντικό πού δέν πρέπει νά παραβλέπουμε.

Διηθοῦμε μέσω ἠθμοῦ, ἀκολούθως ψύχουμε καί ἐξετάζουμε προσεκτικά τό διάλυμα στό τέλος τῆς πρώτης ὥρας καί πάλι στό τέλος τῆς τέταρτης ὥρας. "Αν τό διάλυμα εἶναι ἀπολύτως διαφανές στό τέλος τῆς πρώτης ὥρας ἡ δοκιμή εἶναι ἀρνητική, δηλαδή δέν ὑπάρχει πυρηνέλαιο. "Αν τό διάλυμα εἶναι θολό στό τέλος τῆς πρώτης ὥρας ἐπαναλαμβάνουμε τήν παρατήρηση μετά ἀπό τέσσερις ὥρες.

"Αν στό τέλος τῆς τέταρτης ὥρας τό διάλυμα εἶναι ἀκόμη θολό, ἀλλά δέν ἐμφανίζει νιφάδες, ἡ δοκιμή εἶναι καί πάλι ἀρνητική. "Αν ἀντιθέτως παρατηρήσουμε σχηματισμό νιφάδων, ἡ δοκιμή εἶναι θετική δηλαδή ἔχουμε παρουσία πυρηνελαίου.

"Εκφραση τῶν ἀποτελεσμάτων

'Αναζήτηση τῆς παρουσίας πυρηνελαίου (μέθοδος τροποποιημένη Vizern): θετική ἤ ἀρνητική.

Παρατηρήσεις

Τά ἐλαιόλαδα δίδουν διαφανές ἤ, τό πολύ, ἐλαφρῶς γαλακτῶδες διάλυμα καθ' ὅλη τή διάρκεια τῆς δοκιμῆς. Τά καθαρά ἤ μεμιγμένα πυρηνέλαια ἐμφανίζουν χαρακτηριστικές νιφάδες, αἰωρούμενες σάν μικρά νέφη, οἱ ὁποῖες τελικῶς καθιζάνουν ἄν τό διάλυμα μείνει σέ ἠρεμία γιά ἀρκετές ὥρες.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΣΑΠΩΝΩΝ ΔΙΑ ΤΗΣ ΕΞΑΚΡΙΒΩΣΕΩΣ ΤΗΣ ΑΛΚΑΛΙΚΟΤΗΤΟΣ

Ἀρχή τῆς μεθόδου:

Ἡ ἀποκάλυψη τῶν ἀλκαλικῶν σαπώνων ὡς ἐκ τῆς δράσεώς τους ἐπί τοῦ μπλέ τῆς θρωμοφαινόλης.

Ἀντιδραστήρια

— διάλυμα 0,1 % μπλέ τῆς θρωμοφαινόλης σέ αἰθανόλη 96 % (v/v),

— προσφάτως ἀποσταχθείσα ἀκετόνη, στήν ὁποία προσετέθη 2 % (v/v) νερό.

Ἡ ἀκετόνη 2 % μέ τό νερό πρέπει, μέ προσθήκη μερικῶν σταγόνων διαλύματος μπλέ τῆς θρωμοφαινόλης, νά δίδει κιτρίνη ἤ πρασινοκίτρινη χρώση.

Συσκευαί

— Δοκιμαστικοί σωλῆνες 150 mm × 15 mm.

Τρόπος ἐργασίας

Εἰσάγουμε μέσα σέ δοκιμαστικό σωλήνα 10 ml ἀκετόνης καί μία σταγόνα διαλύματος μπλέ-θρωμοφαινόλης. Τό διάλυμα πρέπει νά χρωματισθεῖ κίτρινο. Ἄν ὄχι, διαθρέχουμε τό σωλήνα καί τό πῶμα του μέ ἀκετόνη μέχρις ὅτου ἐξαφανισθεῖ ὁ μπλέ χρωματισμός. Προσθέτουμε 10 g ἐλαίου μέσα στό σωλήνα, τόν κλείομε μέ τό πῶμα του, ἀνακινοῦμε καί ἀφήνουμε σέ ἠρεμία. Ὁ μπλέ χρωματισμός στήν ἀνωτέρα στιβάδα τῆς ἀκετόνης δεικνύει τήν παρουσία σάπωνος.

Ἔκφραση τῶν ἀποτελεσμάτων

Τά ἀποτελέσματα ἐκφράζονται ὡς θετικά ἤ ἀρνητικά.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΑΝΑΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

Σκοπός τῆς μεθόδου εἶναι ὁ προσδιορισμός, ἐντός τῶν ἐλαίων καί λιπῶν, τῆς συνθέσεως τοῦ κλάσματος τῶν λιπαρῶν ὀξέων τά ὁποῖα εἶναι ἐστεροποιημένα στή θέση 2 (θέση β ἤ ἐσωτερική θέση) τῆς γλυκερίνης, δεδομένου ὅτι τά ἀναεστεροποιημένα ἐλαιόλαδα περιέχουν περισσότερο παλμιτικό ὀξύ στή θέση 2 ἀπό ὅ,τι τά μή ἀναεστεροποιημένα ἐλαιόλαδα.

Ἀρχή

Ἡ μέθοδος αὐτή βασίζεται στή μερική καί εἰδική ὑδρόλυση τῶν τριγλυκεριδίων μέ παγκρεατική λίπαση καί προτιμησιακό σχηματισμό 2-μονογλυκεριδίων. Αὐτή ἡ ὑδρόλυση δίδει ἕνα μίγμα περιέχον διγλυκερίδια, 2-μονογλυκερίδια καί μερικά ἐλεύθερα λιπαρά ὀξέα καί ἐπιπροσθέτως μή ὑδρολυθέντα τριγλυκερίδια. Αὐτό τό μίγμα διαχωρίζεται διά χρωματογραφίας λεπτῆς στιβάδος καί τά μονογλυκερίδια ἀπομονώνονται. Τά μονογλυκερίδια μετατρέπονται μέ μεθανόλη σέ μεθυλεστέρες, οἱ ὁποῖοι ἀναλύονται μέ ἀέριο χρωματογραφία.

Ἄν τό ποσοστό τοῦ παλμιτικοῦ ὀξέος στή θέση 2 τῶν τριγλυκεριδίων ὑπερβαίνει τό 2 %, τό ἀναλυθέν προϊόν πρέπει νά θεωρεῖται ὅτι περιέχει προσμίξεις ἀναεστεροποιημένων ἐλαίων.

1. **Ἐξοπλισμός**

— διαχωριστική χοάνη τῶν 500 ml,

— ὑαλίνη χρωματογραφική στήλη, ἐσωτερικῆς διαμέτρου 13 mm καί μήκους 400 mm, ἐφοδιασμένη μέ πλάκα ἐξ ὑάλου fritté καί στρόφιγγα,

— εὐρύλαιμο σφαιρική φιάλη τῶν 250 ml,

— σφαιρική φιάλη τῶν 100 ml,

— δοκιμαστικοί σωλῆνες φυγοκέντρου, μέ ἐσμυρισμένο πῶμα, τῶν 10 ml,

— ὑποδερμική σύριγγα τοῦ 1 ml ἐφοδιασμένη μέ λεπτή βελόνα,

— σφαιρική φιάλη τῶν 25 ml, μέ ἀεριοψυκτήρα μήκους 1 m μέ ἐσμυρισμένη σύνδεση,
— ποτήρι ζέσεως τῶν 50 ml,
— προχοΐδα 5 ml, βαθμολογημένη εἰς 1/20 ml,
— ἐπιστρωτή χρωματογραφίας λεπτῆς στιβάδος μέ ὑάλινες πλάκες 20 × 20 cm,
— μικροσύριγγα δίδουσα σταγόνες τῶν 3 ἕως 4 ml,
— δοχεῖο ἀναπτύξεως χρωματογραφίας λεπτῆς στιβάδος,
— περιστροφικό βραστήρα,
— πυριαντήριο ρυθμισμένο στούς 103 ° ± 2 °C,
— θερμοστάτη ρυθμισμένο μεταξύ 30 καί 45 °C μέ ἀνοχή ± 0,5 °C,
— ἀναδευτήρα ἠλεκτρικό δονούμενο, κατάλληλο γιά ἰσχυρή ἀνατάραξη τῶν δοκιμαστικῶν σωλήνων τῆς φυγοκέντρου,
— ψεκαστήρα, χρωματογραφίας λεπτῆς στιβάδος,
— λυχνία ὑπεριωδῶν γιά τήν ἐξέταση τῶν χρωματογραφικῶν πλακῶν,
— ἐργαστηριακό ἀναδευτήρα γιά τή διασπορά καί τήν ἀνάμιξη ἑτερογενῶν ὑλικῶν,
— πεχάμετρο,
— ἀναδευτήρα μέ ἕλικα,
— χρονόμετρο.

2. **Ἀντιδραστήρια**

— ὑδατικό διάλυμα ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 12% (m/v),
— διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης 1 % (m/v) σέ αἰθανόλη 95% (v/v),
— διαιθυλικό αἰθέρα, ἐλεύθερο ὑπεροξειδίων,
— ἰσοπροπυλική ἤ αἰθυλική ἀλκοόλη, 95% (v/v), p.a.
— ἐνεργοποιημένη ἀλουμίνα χρωματογραφίας, οὐδέτερη, βαθμοῦ δραστικότητος Brockmann I, προσφάτου ἐνεργοποιήσεως διά θερμάνσεως ἐπί 2 ὥρες στούς 206 °C καί ἐν συνεχεία διατηρήσεως ἐντός ξηραντῆρος,
— ἑξάνιο ἤ ἐλλείψει τούτου, πετρελαϊκός αἰθέρας (σημεῖο ζέσεως: 30 ἕως 50 °C), χρωματογραφικῆς καθαρότητος,
— μυρμικικό ὀξύ τουλάχιστον 98 % (m/m),
— παγκρεατική λίπαση καταλλήλου δραστικότητος (σημειώσεις 1 καί 2),
— ρυθμιστικό διάλυμα συνιστάμενο ἀπό ὑδατικό διάλυμα 1 M τριυδροξυμεθυλαμινομεθανίου προσαρμοζόμενο σέ pH 8 δι' ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος 6 N (ποτενσιομετρικός ἔλεγχος),
— ὑδατικό διάλυμα 0,1 % (m/v) χολικοῦ νατρίου (ἐνζυματικοῦ βαθμοῦ),
— διάλυμα ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος 6 N,
— διαλύτης ἀναπτύξεως πού περιλαμβάνει ἑξάνιο (ἤ, ἐλλείψει τούτου, πετρελαϊκό αἰθέρα) /διαιθυλικό αἰθέρα/μυρμικικό ὀξύ σ' ἀναλογίες 70/30/1 (v/v/v),
— ὑδατικό διάλυμα ἀραβικοῦ κόμμεος 10 % (m/v),
— ὑδατικό διάλυμα χλωριούχου ἀσβεστίου ($CaCl_2$) 22 % (m/v),
— ἀλκοολικό διάλυμα τῆς 2'-7'-διχλωροφλουορεσκεΐνης 0,2 % (m/v) καθιστάμενο ἐλαφρά ἀλκαλικό μέ προσθήκη μίας σταγόνας διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 1 N ἀνά 100 ml,
— ὀξείδιο τοῦ πυριτίου σέ σκόνη μετά συνδετικοῦ ὑλικοῦ καθαρότητος χρωματογραφίας λεπτῆς στιβάδος,
— ὑδατικό διάλυμα χολικοῦ νατρίου 20 % (m/v),
— ὑδατικό διάλυμα τοῦ ὑδροξειδίου νατρίου 0,1 N,
— ἐξουδετερωθέν ἔλαιο φυτικό.

3. **Προετοιμασία τοῦ δείγματος**

Ἄν ἡ ὀξύτητα τοῦ δείγματος εἶναι μέχρι 3%: ἄμεση ἐξουδετέρωση διά μέσου ἀλουμίνας ὅπως στό 3.2.

Ἄν ἡ ὀξύτητα τοῦ δείγματος ὑπερβαίνει τό 3%: ἐξουδετέρωση δι' ἀλκάλεως παρουσία διαλύτου ὅπως στό 3.1 καί ἐν συνεχεία διέλευση διά μέσου ἀλουμίνας ὅπως στό 3.2.

3.1. *Ἐξουδετέρωση δι' ἀλκάλεως παρουσία διαλύτου*

Ἐντός διαχωριστικῆς χοάνης 500 ml ἐγχύσατε περίπου 10 g ἀνεπεξέργαστου ἐλαίου, 100 ml ἑξανίου ἤ, ἐλλείψει τούτου, πετρελαϊκοῦ αἰθέρα, 50 ml ἰσοπροπυλικῆς ἀλκοόλης ἤ αἰθυλικῆς ἀλκοόλης 95°, μερικές σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης καί ποσότητα διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 12 % ἀντιστοιχούσα στήν ἐλεύθερη ὀξύτητα τοῦ ἐλαίου μέ περίσσεια 0,3 %. Ἀναδεύουμε ἰσχυρῶς γιά ἕνα λεπτό, προσθέτομε 50 ml ἀπεσταγμένου ὕδατος, ἀναδεύουμε ἐκ νέου καί ἀφήνουμε σέ ἠρεμία.

Μετά τό διαχειρισμό, ἀπομακρύνουμε τήν κατωτέρα στιβάδα τήν περιέχουσα τούς σάπωνες. Ἀπομακρύνουμε τίς τυχόν ἐνδιάμεσες στιβάδες (μηκυλιώματα καί ἀδιάλυτα συστατικά), ξεπλένουμε ἀπό τό διάλυμα τοῦ ἑξανίου τό ἐξουδετερωθέν ἔλαιο, διαδοχικά, μέ ποσότητες 25 ἤ 30 ml διαλύματος 1:1 (v/v) ἰσοπροπυλικῆς ἀλκοόλης ἤ αἰθυλικῆς ἀλκοόλης καί ἀπεσταγμένου νεροῦ μέχρι ἐξαφανίσεως τοῦ ροδαλοῦ χρώματος τῆς φαινολοφθαλεΐνης. Ἀπομακρύνουμε τό μεγαλύτερο μέρος τοῦ ἑξανίου μέ ἀπόσταξη σέ κενό καί θέτομε τό ἔλαιο πρός ξήρανση στούς 30° ἕως 40° C, ἐν κενῷ, σέ ρεῦμα καθαροῦ ἀζώτου, μέχρι πλήρους ἐξατμίσεως τοῦ διαλύτου.

3.2. *Πέρασμα διά μέσου ἀλουμίνας*

Παρασκευάζουμε αἰώρημα ἀπό 15 g ἐνεργοποιημένης ἀλουμίνας ἐντός 50 ml ἑξανίου ἤ ἐλλείψει αὐτοῦ πετρελαϊκοῦ αἰθέρος καί τό εἰσάγουμε, ἀναδεύοντες, μέσα σέ ὑαλίνη χρωματογραφική στήλη. Ρυθμίζουμε τήν κατανομή τῆς ἀλουμίνας καί ἀπομακρύνουμε τό διαλύτη μέχρις ὅτου φθάσει σέ ἐπίπεδο κατά 1 – 2 mm ἀνώτερο ἀπό τήν ἄνω ἐπιφάνεια τοῦ ἀπορροφητικοῦ. Εἰσάγουμε προσεκτικῶς στή στήλη διάλυμα, παρασκευασθέν 15 λεπτά ἐνωρίτερα διά διαλύσεως 5 g ἐλαίου ἐντός 25 ml ἑξανίου ἤ ἐλλείψει αὐτοῦ πετρελαϊκοῦ αἰθέρος καί συλλέγουμε μέσα σέ σφαιρική φιάλη τῶν 100 ml ὅλη τή ρέουσα ποσότητα.

'Απομακρύνουμε τό μεγαλύτερο μέρος τοῦ διαλύτου μέ ἀπόσταξη ἐν κενῷ καί θέτουμε τό ἔλαιο πρός ξήρανση στούς 30° ἕως 40 °C, ἐν κενῷ, μέσα σέ ρεῦμα καθαροῦ ἀζώτου μέχρι πλήρους ἀπομακρύνσεως τοῦ διαλύτου.

4. **Προετοιμασία τῶν χρωματογραφικῶν πλακῶν**

'Εντός εὐρυλαίμου σφαιρικῆς φιάλης τῶν 250 ml τοποθετοῦμε 30 g ὀξειδίου τοῦ πυριτίου σέ σκόνη καί 60 ml ἀπεσταγμένου ὕδατος καί ἀνακινοῦμε μέχρι τελείας ὁμογενοποιήσεως. 'Εξαεροῦμε διά τῆς τοποθετήσεως ὑπό κενό ἀντλίας νεροῦ γιά ἕνα λεπτό.

'Επιστρώνουμε τό ὑλικό κατά τό συνήθη τρόπο στίς πλάκες μέ τή βοήθεια τοῦ ἐπιστρωτοῦ, καί μέ πάχος στρώσεως 0,25 mm.

Αὐτή ἡ ποσότης τοῦ ὑλικοῦ εἶναι ἀρκετή γιά ἐπίστρωση πέντε πλακῶν 20 × 20 cm.

'Ακολούθως οἱ πλάκες ξηραίνονται στόν ἀέρα γιά 15 λεπτά περίπου καί ἀκολουθεῖ ξήρανση μέσα σέ φοῦρνο θερμοκρασίας 103 ° ± 2 °C ἐπί δύο ὥρες.

Φυλάσσονται οἱ πλάκες σέ ξηραντήρα.

5. **Τρόπος ἐργασίας**

5.1. *'Υδρόλυση μέ παγκρεατική λίπαση*

Μέσα σέ δοκιμαστικό σωλήνα φυγοκέντρου τῶν 10 ml ζυγίζουμε 0,1 g περίπου τοῦ παρασκευασθέντος δείγματος.

Προσθέτουμε 20 mg λιπάσης καί 2 ml ρυθμιστικοῦ διαλύματος. 'Αναδεύουμε προσεκτικῶς καί μέ κατάλληλες προφυλάξεις, καί μετά προσθέτουμε 0,5 ml διαλύματος χολικοῦ νατρίου 0,1 % καί 0,2 ml διαλύματος χλωριούχου ἀσβεστίου. Κλείνουμε τό σωλήνα δι' ἐσμυρισμένου πώματος ἀνακινοῦμε προσεκτικῶς (χωρίς νά βραχεῖ τό πῶμα) καί θέτομε ἀμέσως τό σωλήνα ἐντός θερμοστάτου ρυθμισμένου στούς 40 °C ± 0,5 °C γιά ἕνα λεπτό ἀκριβῶς καί ὑπό συνεχή ἀνάδευση.

'Απομακρύνουμε τό σωλήνα ἀπό τό θερμοστάτη καί ἀνακινοῦμε ἰσχυρῶς γιά δύο λεπτά ἀκριβῶς.

Ψύχουμε ἀμέσως κάτω ἀπό ρέον νερό καί προσθέτουμε 1 ml διαλύματος ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος 6 N καί 1 ml διαιθυλικοῦ αἰθέρα. Πωματίζουμε καί ἀνακινοῦμε ἰσχυρῶς. 'Αφήνουμε νά ἠρεμήσει καί ἐν συνεχεία λαμβάνουμε τήν ἀνωτέρα ὀργανική στιβάδα μέ σύριγγα.

5.2. *Διαχωρισμός τῶν μονογλυκεριδίων διά χρωματογραφίας λεπτῆς στιβάδος*

'Επί χρωματογραφικῆς πλακός, καί εἰς ἀπόσταση 1,5 cm ἀπό τήν κατωτέρα πλευρά, ἀναπτύσσουμε τό ἐκχύλισμα σέ συνεχή ὁμοιόμορφο γραμμή ὥστε νά ἐπιτύχουμε ὅσο τό δυνατό λεπτότερη γραμμή ἐκκινήσεως.

Εἰσάγουμε τήν πλάκα ἐντός καλῶς κεκορεσμένου δοχείου ἀναπτύξεως καί ἀναπτύσσουμε μέ τό διαλύτη ἀναπτύξεως μέχρι 1 cm κάτω ἀπό τό ἄνω μέρος τῆς πλάκας. 'Η ἀνάπτυξη τῆς πλάκας πρέπει νά λαμβάνει χώρα σέ θερμοκρασία περίπου 20 °C.

Ξηραίνουμε τήν πλάκα στόν ἀέρα στή θερμοκρασία τοῦ δοχείου καί ψεκάζουμε μέ τό διάλυμα τῆς 2'-7'-διχλωροφλουορεσκεΐνης. Ταυτοποιοῦμε τήν ταινία τῶν μονογλυκεριδίων (Rf = 0,035 περίπου) σέ ὑπεριῶδες φῶς, ἀπομακρύνουμε αὐτά μέ μία μεταλλική σπάτουλα (ἀποφεύγουμε τή μετακίνηση κάθε συστατικοῦ πού παρέμεινε στή βασική γραμμή) καί τοποθετοῦμε τό ὀξείδιο τοῦ πυριτίου σέ σφαιρική φιάλη μεθυλιώσεως τῶν 25 ml.

Μετατρέπουμε τά μονογλυκερίδια στούς ἀντίστοιχους μεθυλεστέρες σύμφωνα μέ τή γενική μέθοδο παρασκευῆς τῶν μεθυλεστέρων τῶν λιπαρῶν ὀξέων πού ἀναφέρονται στό σημεῖο 7.3, ἀφοῦ προηγουμένως συλλεγεῖ τό ὀξείδιο τοῦ πυριτίου. Κατόπιν διενεργοῦμε τήν ἀέριο χρωματογραφία τῶν ἐστέρων σύμφωνα μέ τή μέθοδο πού δίδεται στό σημεῖο 7.4.

Εἰς τό αὐτό δεῖγμα προσδιορίζουμε τή σύσταση τῶν συνολικῶν λιπαρῶν ὀξέων, τῆς ὁποίας ἡ σύγκριση μέ ἐκείνη τῶν λιπαρῶν ὀξέων στή θέση-2 εἶναι χρήσιμη γιά τήν ἑρμηνεία τῶν ληφθέντων ἀποτελεσμάτων.

6. **'Έκφραση τῶν ἀποτελεσμάτων**

'Υπολογίζουμε τήν περιεκτικότητα σέ λιπαρά ὀξέα στή θέση -2 ἐπί τοῖς ἑκατό μέ ἕνα δεκαδικό ψηφίο (Σημείωση 3).

7. **Σημειώσεις**

7.1. *Δοκιμή ἐνεργότητος τῆς λιπάσης*

Παρασκευάζουμε γαλάκτωμα ἐλαίου κατόπιν ἀναμίξεως, 165 ml διαλύματος ἀραβικοῦ κόμμεως 10 %, 15 g σπασμένου πάγου καί 20 ml ἐλαίου ἤδη ἐξουδετερωθέντος, ἐντός καταλλήλου ἀναμικτῆρος δι' ἀναδεύσεως ἐπί 10λεπτον.

Ἐντός ποτηρίου 50 ml θέτουμε διαδοχικά 10 ml γαλακτώματος, 0,3 ml διαλύματος χολικοῦ νατρίου 20 % καί 20 ml ἀπεσταγμένου ὕδατος.

Τοποθετοῦμε τό ποτήρι σέ θερμοστάτη ρυθμισμένο στούς 37 ± 0,5 °C καί εἰσάγουμε σ' αὐτό τά ἠλεκτρόδια πεχαμέτρου καί ἕναν ἀναδευτήρα μέ ἕλικα.

Μέ τή βοήθεια προχοΐδος τῶν 5 ml, προσθέτουμε στάγδην διάλυμα ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 0,1 N ἕως ὅτου τό pH γίνει 8,5.

Προσθέτουμε ἐπαρκή ποσότητα αἰωρήματος κόνεως λιπάσης ἐντός ὕδατος (βλέπε κατωτέρω). Ὅταν τό pH κατέβει στό 8,3, θέτουμε σέ λειτουργία τό χρονόμετρο καί προσθέτουμε τό διάλυμα ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 0,1 N μέ κατάλληλο ρυθμό ὥστε τό pH νά διατηρεῖται στό 8,3. Σημειώνουμε κάθε λεπτό τόν ὄγκο τοῦ ἀναλισκομένου ἀλκάλεως.

Φέρουμε τά ληφθέντα στοιχεῖα σέ σύστημα συντεταγμένων, στόν ἄξονα τῶν τετμημένων τούς χρόνους καί στόν ἄξονα τῶν τεταγμένων τά ml τοῦ ἀναλωθέντος ἀλκαλικοῦ διαλύματος γιά τή διατήρηση τοῦ pH σταθεροῦ. Πρέπει νά ληφθεῖ γραμμική καμπύλη.

Τό αἰώρημα τῆς λιπάσης πού ἀναφέρεται στήν προηγούμενη παράγραφο εἶναι αἰώρημα 1 % κατά βάρος ἐντός ὕδατος. Γιά τή δοκιμή χρησιμοποιοῦμε κατάλληλη ποσότητα αἰωρήματος ἔτσι ὥστε νά καταναλώνουμε μέσα σέ τέσσερα ἕως πέντε λεπτά περίπου, 1 ml ἀλκάλεως. Τοῦτο ἐπιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας 1 ἕως 5 mg σκόνης.

Ὡς μονάδα λιπάσης ὁρίζεται ἡ ποσότης ἐκείνη ἐνζύμου πού ἐλευθερώνει 10 μικροϊσοδύναμα ὀξέος ἀνά λεπτό.

Ἐνεργότης A τῆς χρησιμοποιουμένης σκόνης, μετρουμένη σέ μονάδες λιπάσης ἀνά mg:

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

ὅπου V = ὁ ἀριθμός τῶν ml τοῦ διαλύματος τοῦ ὑδροξειδίου τοῦ νατρίου 0,1 N ἀνά λεπτό, ὑπολογιζόμενος ἀπό τό διάγραμμα

m = ἡ μάζα τῆς σκόνης πού χρησιμοποιήσαμε γιά τή δοκιμή, σέ mg.

Ἡ χρησιμοποιουμένη λιπάση πρέπει νά ἔχει ἐνεργότητα ὄχι μικρότερη τῶν 0,8 καί ὄχι μεγαλύτερη τῶν 2 μονάδων λιπάσης ἀνά mg.

7.2. *Παρασκευή τῆς λιπάσης*

Λιπάση μέ ἱκανοποιητική λιπασική ἐνεργότητα εὑρίσκεται στό ἐμπόριο. Εἶναι ἐπίσης δυνατό νά παρασκευασθεῖ στό ἐργαστήριο ὡς ἑξῆς:

Ψύχουμε στούς 0 °C, 5 kg νωποῦ παγκρέατος χοίρου, ἀπαλλαγμένου ἀπό τό περιβάλλον στερεό λίπος καί τό συνδετικό ἱστό καί τό ἀλέθουμε σέ μύλο μέ μαχαίρια ὥστε νά λάβουμε μία ρευστή πάστα. Ἀναταράσσουμε ἐν ψυχρῷ τήν πάστα αὐτή ἐπί 4 ἕως 6 ὥρες μέ 2,5 l ἀνύδρου ἀκετόνης καί ἐν συνεχεία φυγοκεντροῦμε. Ἐκχυλίζουμε τό ὑπόλειμμα τρεῖς ἀκόμη φορές μέ τόν αὐτό ὄγκο ἀκετόνης, δύο φορές μέ μίγμα 1 : 1 (v/v) ἀκετόνης καί διαιθυλεθέρος καί δύο φορές μέ διαιθυλαιθέρα.

Ξηραίνουμε τό ὑπόλειμμα γιά 48 ὥρες ἐν κενῷ, ὥστε νά λάβουμε σταθερή σκόνη ἡ ὁποία πρέπει νά διατηρεῖται ἐντός ψυγείου.

7.3. *Γενική μέθοδος παρασκευῆς τῶν μεθυλεστέρων τῶν λιπαρῶν ὀξέων*

Σύμφωνα μέ τή μέθοδο πού περιγράφεται στό σημεῖο II τοῦ παραρτήματος VI τοῦ κανονισμοῦ (ΕΟΚ) ἀριθ. 72/77 τῆς Ἐπιτροπῆς τῆς 13ης Ἰανουαρίου 1977 περί τροποποιήσεως τοῦ κανονισμοῦ (ΕΟΚ) ἀριθ. 1470/68 περί τῆς λήψεως καί ἀναγωγῆς τῶν δειγμάτων καί τοῦ προσδιορισμοῦ τῆς περιεκτικότητος σέ ἔλαιο, ξένα σώματα καί ὑγρασία τῶν ἐλαιούχων σπόρων[1].

7.4. *Ἀέριος χρωματογραφία τῶν μεθυλεστέρων τῶν λιπαρῶν ὀξέων*

Σύμφωνα μέ τή μέθοδο πού περιγράφεται στό σημεῖο III τοῦ παραρτήματος VI τοῦ κανονισμοῦ (ΕΟΚ) ἀριθ. 72/77.

---

[1] **ΕΕ** ἀριθ. N 12 τῆς 15.1.1977, σ. 11.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VIII

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΑΛΛΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ: ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΡΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ

Ἀρχή

Ἀέριος χρωματογραφία τῶν στερολῶν παρασκευασμένων μέ χρησιμοποίηση χρωματογραφίας λεπτῆς στιβάδος ἀπό τά προσεκτικῶς ξηρανθέντα ἀσαπωνοποίητα συστατικά.

Ἐξοπλισμός

1. Συσκευή χρωματογραφίας λεπτῆς στιβάδος, περιλαμβάνουσα εἰδικώτερα τέσσερις ὑάλινες πλάκες διαστάσεων 20 × 20 × 0,4 cm, δύο πλάκες διαστάσεων 20 × 5 × 0,4 cm καί μία μικροσύριγγα 0,1 ml.
2. Ποτήρι ζέσεως τῶν 50 ml.
3. Πορώδη φίλτρα, διαμέτρου 15 mm, πορώδους 3.
4. Σφαιρική φιάλη τῶν 100 ml.
5. Δοκιμαστικοί σωλῆνες φυγοκέντρου κωνικῆς βάσεως τῶν 10 ml, ἐφοδιασμένοι μέ ἐσμυρισμένο πῶμα.
6. Σιφώνια βαθμολογημένα τοῦ 1 ml.
7. Συσκευή ἀερίου χρωματογραφίας ἐφοδιασμένη μέ ἀνιχνευτή ἰονισμοῦ φλογός μετά συστήματος ἐνέσεως ἐξ ἀργύρου ἤ ὑάλου ἤ μέ σύστημα ἀπ' εὐθείας ἐνέσεως στή στήλη συνδεδεμένη μέ καταγραφέα.
8. Στήλη ἀερίου χρωματογραφίας ἀπό ὕαλο ἤ ἀνοξείδωτο χάλυβα σχήματος U ἤ σπιράλ μήκους 1 ἕως 2 μέτρων καί ἐσωτερικῆς διαμέτρου 3 ἕως 4 mm, μέ στατική φάση ἐλαστικῆς σιλικόνης [(Μεθυλικοῦ τύπου)([1])] σταθερή τουλάχιστον μέχρι τούς 300 °C, ἐμποτίζουσα σέ ποσοστό 2-4 % μία ἀποτεφρωμένη γῆ διατόμων, καθαρισθείσα μέ ὀξύ καί σιλανοποιημένη κοκκομετρικῆς συστάσεως 80/100 ἤ 100/120 mesh.

   Σημείωση: Συνιστοῦμε τήν ὑάλινη στήλη, διότι μερικοί τύποι ἀνοξειδώτου χάλυβος δύνανται νά προκαλέσουν λανθασμένα ἀποτελέσματα λόγω ἀποσυνθέσεως τῶν στερολῶν.
9. Μικροσύριγγα δυνάμενη νά δώσει δόσεις πού φθάνουν τά 5 ἤ 10 μl.

Ἀντιδραστήρια

1. Χλωροφόρμιο, χρωματογραφικῆς καθαρότητος.
2. Βενζόλιο, χρωματογραφικῆς καθαρότητος.
3. Ἑπτάνιο.
4. Silica gel (παραδείγματος χάριν Kieselgel G).
5. Διάλυμα συγκρίσεως γιά χρωματογραφία ἐπί πλακός περιέχον 5 % χοληστερόλη ἐντός χλωροφορμίου.
6. Ἀκετόνη χρωματογραφίας.
7. Διάλυμα 0,1 % τοῦ μετά νατρίου ἄλατος τῆς 2'-7'-διχλωροφλουορεσκεΐνης ἐντός ἀπολύτου ἀλκοόλης.
8. Πυριδίνη.
9. Ἑξαμεθυλοδισιλαζάνιο (hexamethyldisilazane).
10. Τριμεθυλοχλωροσιλάνιο.
11. Διάλυμα γιά τό τέστ εὐαισθησίας περιέχον 1 mg χοληστερόλης ἀνά ml κανονικοῦ πεντανίου.
12. Διάλυμα προτύπου δοκιμῆς τῶν καμπυλῶν περιέχον 0,9 mg φυτοστερολῶν ἐλαίου κραμβοσπόρων καί 0,1 mg χοληστερόλης ἀνά ml κανονικοῦ πεντανίου. Οἱ στερόλες πρέπει νά εἶναι πρόσφατα παρασκευασμένες σύμφωνα μέ τή μέθοδο πού περιγράφεται στήν περίπτωση Β τοῦ τρόπου ἐργασίας.
13. Διάλυμα συγκριτικῆς δοκιμῆς περιέχον 1 mg φυτοστερολῶν ἡλιανθέλαιου πρόσφατα παρασκευασμένων ὅπως περιγράφεται στήν περίπτωση Β τοῦ τρόπου ἐργασίας, ἀνά ml κανονικοῦ πεντανίου.

Παρασκευή τῶν χρωματογραφικῶν πλακῶν

Ἐπί τοῦ ἐπιστρωτοῦ τοποθετοῦμε κατά σειρά μία πλάκα 20 × 5 × 0,4 cm τέσσερις πλάκες 20 × 20 × 0,4 cm καί μία πλάκα 20 × 5 × 0,4 cm.

([1]) Παραδείγματος χάριν SE 30.

Σέ εὐρύλαιμο σφαιρική φιάλη τῶν 500 ml θέτουμε 40 gr silica gel καί 80 ml νεροῦ. 'Αναδεύουμε μέ ὑάλινη ράβδο ἤ ἐνδεχόμενα μέ ὑάλινο μηχανικό ἀναδευτήρα μέχρι τελείας ὁμογενοποιήσεως. 'Απομακρύνομε κάθε ἀέριο διά δημιουργίας κενοῦ, χρησιμοποιώντας ἀντλία ὕδατος, γιά ἕνα τουλάχιστο λεπτό. Κατόπιν, μεταφέρουμε τό αἰώρημα ἐπί τοῦ ἐπιστρωτοῦ καί ἐπιστρώνουμε τίς πλάκες ὁμοιομόρφως μέ πάχος 0,5 mm. 'Ακολουθεῖ ξήρανση τῶν πλακῶν στόν ἀέρα γιά 15 λεπτά περίπου καί ἐν συνεχεία ξήρανση μέσα σέ φοῦρνο στούς 105 °C γιά δύο ὥρες. Φυλάσσομε τίς οὕτω παρασκευασθεῖσες πλάκες μέσα σέ ξηραντήρα κενοῦ.

ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Α. Παρασκευή τῶν ἀσαπωνοποίητων συστατικῶν

Εἰσαγωγή

'Ασαπωνοποίητα συστατικά ὁρίζονται οἱ διαλυτές στό λίπος οὐσίες, οἱ ὁποῖες, μετά τή σαπωνοποίηση, εἶναι ἀδιάλυτες στό νερό ἀλλά διαλυτές στό διαλύτη πού χρησιμοποιοῦμε στόν προσδιορισμό. Αὐτά περιλαμβάνουν τά φυσικά συστατικά τῶν λιπαρῶν οὐσιῶν (στερόλες, ἀλκοόλες καί ὑδρογονάνθρακες) καθώς ἐπίσης καί τίς μή πτητικές στούς 100 °C ὀργανικές ὕλες (ὀρυκτέλαια) ξένες πρός τίς λιπαρές ὕλες πού εἶναι δυνατόν νά περιέχονται. 'Ο πετρελαϊκός αἰθέρας ἤ ὁ διαιθυλαιθέρας εἶναι οἱ συνήθως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες. Πρέπει νά λαμβάνεται ὑπόψη ὅτι τά ἀποτελέσματα διαφέρουν τίς περισσότερες φορές, ἀνάλογα μέ τό διαλύτη, γενικῶς δέ μέ τό διαιθυλαιθέρα ἐξευρίσκονται περιεκτικότητες % ἀνώτερες. Στήν περίπτωση τοῦ ἐλαιολάδου, ὁ πετρελαϊκός αἰθέρας ἔχει ἀναγνωρισθεῖ ὡς ὁ διαλύτης πού πρέπει νά χρησιμοποιεῖται, λαμβανομένων ὑπόψη τῶν κλιματικῶν συνθηκῶν στίς ὁποῖες εὑρίσκονται τά περισσότερα ἐργαστήρια.

Μέθοδος πετρελαϊκοῦ αἰθέρος

'Εξοπλισμός

— φιάλη τῶν 150 ml δυναμένη νά προσαρμοστεῖ σέ ψυκτήρα ἐπαναφορᾶς,

— διαχωριστικές χοάνες 500 ml,

— φοῦρνος ρυθμισμένος στούς 103 °C (± 2 °C).

'Αντιδραστήρια

Αἰθανολικό διάλυμα ὑδροξειδίου τοῦ καλίου κανονικότητος περίπου 2 N ἐντός αἰθανόλης 95 % (v/v). Τό ἀντιδραστήριο δέν πρέπει νά εἶναι χρώματος σκοτεινότερου ἀπό τό ἀχυρόχρουν.

Πετρελαϊκός αἰθέρας (ἀποστάζων στούς 40 ° ἕως 60 °C, μέ δείκτη θρωμίου κατώτερο τοῦ 1, χωρίς ὑπολείμματα).

Τρόπος ἐργασίας

Ζυγίζουμε περίπου 5 g λιπαρῆς οὐσίας μέ ἀκρίβεια 0,01 g ἐντός τῆς φιάλης.

Προσθέτουμε 50 ml αἰθανολικοῦ διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ καλίου 2 N περίπου. Προσαρμόζουμε στόν ψυκτήρα. Βράζουμε μέ ἤπιο θρασμό, γιά μία ὥρα.

Σταματοῦμε τή θέρμανση. Προσθέτουμε 50 ml ἀπεσταγμένου ὕδατος ἀπό τό ἐπάνω μέρος τοῦ ψυκτῆρος καί ἀνακινοῦμε.

Μετά ψύξη, μεταφέρουμε τό ὅλο ἐντός διαχωριστικῆς χοάνης καί ξεπλένουμε τή φιάλη ἀρκετές φορές χρησιμοποιώντας συνολικά 50 ml πετρελαϊκοῦ αἰθέρος.

'Ανακινοῦμε δυνατά γιά ἕνα λεπτό.

'Αφήνουμε τή φιάλη νά ἠρεμήσει μέχρι πλήρους διαχωρισμοῦ τῶν δύο φάσεων καί συλλέγουμε τό διάλυμα τοῦ σάπωνος μέσα σέ δεύτερη διαχωριστική χοάνη. 'Εάν σχηματισθεῖ, κατ' ἐξαίρεση, γαλάκτωμα, τό καταστρέφουμε μέ προσθήκη μικρῶν ποσοτήτων αἰθανόλης ἤ συμπυκνωμένου διαλύματος ὑδροξειδίου τοῦ καλίου.

'Εκπλένουμε τήν παραμένουσα φάση δύο ἀκόμη φορές, χρησιμοποιώντας 50 ml πετρελαϊκοῦ αἰθέρος κάθε φορά.

Συγκεντρώνουμε τά τρία αἰθερικά κλάσματα μέσα στήν αὐτή διαχωριστική χοάνη, τά ξεπλένουμε τρεῖς φορές μέ 50 ml αἰθανόλης 50 % (v/v).

Μεταγγίζουμε τό αἰθερικό ἐκχύλισμα ποσοτικῶς, μέ περισσότερες τῆς μιᾶς κινήσεις ἐάν χρειάζεται, ἀπό τήν κορυφή τῆς χοάνης, μέσα σέ προζυγισθείσα φιάλη τῶν 250 ml (ξεπλένοντας τή χοάνη μέ μικρές ποσότητες πετρελαϊκοῦ αἰθέρος).

'Απομακρύνουμε τό διαλύτη διά προσεκτικῆς θερμάνσεως ἐν κενῷ καί ξηραίνομε τό ὑπόλειμμα ἐν κενῷ σέ θερμοκρασία κατωτέρα τῶν 50 °C γιά νά ἀποφύγουμε ἀνεπιθύμητες ὀξειδώσεις.

Β. Διαχωρισμός τοῦ κλάσματος τῶν στερολῶν μέ χρήση χρωματογραφίας λεπτῆς στιβάδος

Ἐντός θαλάμου ἀναπτύξεως τοποθετοῦμε μέχρι ὕψους 1 cm περίπου μίγμα 85/15 (v/v) η-ἑπτανίου καί ἀκετόνης ἤ 95/5 (v/v) βενζολίου καί ἀκετόνης. Κλείνουμε μέ τό σκέπασμα καί ἀκολούθως περιμένουμε κατ' ἐλάχιστο τρεῖς ὥρες ὥστε ν' ἀποκατασταθεῖ ἰσορροπία μεταξύ ὑγροῦ καί ἀτμοῦ. Συνιστᾶται νά τοποθετοῦνται λωρίδες διηθητικοῦ χάρτου ἐπί τῶν ἐσωτερικῶν τοιχωμάτων τοῦ θαλάμου θυθισμένες στό ὑγρό ἀναπτύξεως. Μέ τόν τρόπο αὐτό θά ἐλαττωθεῖ στό τρίτο ὁ χρόνος μετακινήσεως τοῦ μετώπου τοῦ ὑγροῦ καί θά ἐπιτευχθεῖ περισσότερο ὁμοιόμορφη ἔκλουση.

Ἐν τῷ μεταξύ, παρασκευάζουμε διάλυμα 5 % τῶν ἀσαπωνοποιήτων συστατικῶν ἐκχυλισθέντων διά πετρελαϊκοῦ αἰθέρος, ἐντός χλωροφορμίου. Λαμβάνουμε 0,3 ml ἀπό αὐτό τό διάλυμα καί τό ἀποθέτουμε, χρησιμοποιώντας τή μικροσύριγγα τῶν 0,1 ml, σέ συνεχή καί ὁμοιόμορφο γραμμή, ἐπί τῆς χρωματογραφικῆς πλακός καί σέ ὕψος 1,5 cm ἀπό τό κάτω μέρος τῆς πλάκας, ἔτσι ὥστε νά λάβουμε μία λεπτή κατά τό δυνατό, γραμμή βάσεως. Στή συνέχεια, μέ τή συνήθη τεχνική, ἀποθέτουμε μερικά ml τοῦ προτύπου διαλύματος πού περιέχει τή χοληστερόλη στό ἕνα ἄκρο τῆς πλάκας ἔτσι ὥστε νά ἐλέγξουμε τήν τιμή τοῦ Rf τοῦ κλάσματος τῶν στερολῶν.

Τοποθετοῦμε ἐντός τοῦ θαλάμου ἀναπτύξεως τήν πλάκα παρασκευασμένη ὅπως ἐπεξηγεῖται ἀνωτέρω. Ἡ θερμοκρασία δωματίου πρέπει νά εἶναι γύρω στούς 20 °C. Κλείομε τό θάλαμο μέ τό σκέπασμα καί ἀναπτύσσουμε μέχρις ὅτου τό μέτωπο τοῦ διαλύτου ἀνέλθει σέ ὕψος 1 cm, κάτω ἀπό τό ἄνω ἄκρο τῆς πλάκας. Ἐξάγουμε τήν πλάκα ἀπό τό δοχεῖο καί ἀκολουθεῖ ἐξάτμιση τοῦ διαλύτου σέ ρεῦμα θερμοῦ ἀζώτου.

Ψεκάζουμε τήν πλάκα προσεκτικῶς καί ὁμοιομόρφως μέ τό αἰθανολικό διάλυμα τοῦ μετά νατρίου ἅλατος τῆς 2'-7'-διχλωροφλουορεσκεΐνης. Μέ ἐξέταση τῆς πλάκας σέ ὑπεριῶδες φῶς, προσδιορίζεται ἡ θέση τῶν στερολῶν χάρη στήν εὐθυγράμμισή τους μέ τήν κηλίδα τῆς χοληστερόλης πού προέρχεται ἀπό τό πρότυπο διάλυμα. Συλλέγουμε τή λωρίδα τῶν στερολῶν ξύνοντάς την μέ μία μεταλλική σπάτουλα. Τοποθετοῦμε τήν παραληφθείσα Silica gel μέσα σέ ποτήρι ζέσεως τῶν 50 ml μαζί μέ 15 ml θερμοῦ χλωροφορμίου, ἀνακινοῦμε καί μεταφέρουμε τό ὅλο μέσα στό πορῶδες φίλτρο καί διηθοῦμε.

Ξεπλένουμε τό φίλτρο τρεῖς φορές, κάθε φορά μέ 15 ml θερμοῦ χλωροφορμίου, συλλέγοντες τό διήθημα μέσα σέ φιάλη σφαιρική τῶν 100 ml.

Ἐξατμίζουμε τό χλωροφόρμιο μέχρι τελικοῦ ὄγκου 4 ἕως 5 ml καί τοποθετοῦμε αὐτό ἐντός προζυγισθέντος δοκιμαστικοῦ σωλῆνος φυγοκέντρου ἐφοδιασμένου μέ ἐσμυρισμένο πῶμα. Ξηραίνουμε, ἐξατμίζοντας τό διαλύτη μέ προσεκτική θέρμανση σέ ρεῦμα ἀζώτου, καί ζυγίζουμε τό ληφθέν κλάσμα τῶν στερολῶν.

Γ. Ἀεριοχρωματογραφική ἀνάλυση τῶν στερολῶν

1. *Παρασκευή τῶν τριμεθυλοσιλιλαιθέρων (TMSE)*

Ἐντός τοῦ δοκιμαστικοῦ σωλῆνος τοποθετοῦμε, γιά κάθε mg στερολῶν, 0,02 ml ἀντιδραστηρίου σιλιλαιθεροποιήσεως (Silanization) ἀποτελούμενο ἀπό μίγμα 9/3/1 (v/v/v) πυριδίνης, ἐξαμεθυλοδισιλαζανίου καί τριμεθυλοχλωροσιλανίου ἐνεργοῦντες προσεκτικά γιά τήν ἀποφυγή κάθε ἴχνους ὑγρασίας. Τοποθετοῦμε τό σωλήνα ἐντός ξηραντῆρος ἐπί 30 λεπτά περίπου, κατόπιν τοποθετοῦμε τό πῶμα του καί φυγοκεντροῦμε γιά μερικά λεπτά. Τό ἀπομένον διάλυμα λαμβάνεται γιά τήν πραγματοποίηση τῆς ἑπομένης ἀναλύσεως.

2. *Συνθῆκες ἀεριοχρωματογραφικῆς ἀναλύσεως*

Θερμοκρασία στήλης: 220 ἕως 250 °C.

Ἄν θερμαίνεται ξεχωριστά, τό σύστημα ὑποδοχῆς τοῦ δείγματος πρέπει νά ἔχει θερμοκρασία κατά 20° ἕως 40° ἀνωτέρα ἀπό τή θερμοκρασία τῆς στήλης. Ροή ἀζώτου: 30 ἕως 60 ml ἀνά λεπτό. Ἀποσυνδέεται ὁ ἀνιχνευτής καί ἰσορροπεῖται κάθε νέα στήλη στίς ἀνωτέρω συνθῆκες γιά 16 ἕως 24 ὥρες. Συνδέουμε τόν ἀνιχνευτή, ἀνάβουμε τή φλόγα ρυθμίζοντας τήν ταχύτητα ροῆς ὑδρογόνου, ὀξυγόνου ἤ ἀέρος ἔτσι ὥστε νά ἔχουμε τό ἐπιθυμητό ὕψος φλόγας καί εὐαισθησία. Θέτουμε σέ λειτουργία τόν καταγραφέα, ρυθμίζουμε τήν ταχύτητα τοῦ χάρτου, τό μηδέν καί τήν εὐαισθησία. Ὅταν ἡ γραμμή βάσεως σταθεροποιηθεῖ ἡ συσκευή εἶναι ἕτοιμη πρός χρησιμοποίηση.

3. *Δοκιμή εὐαισθησίας*

Λαμβάνουμε 5 ml τοῦ διαλύματος τοῦ τέστ εὐαισθησίας, ἐξατμίζουμε τό διαλύτη καί ἐνεργοῦμε ὅπως στήν παράγραφο 1. Ἐνίουμε 0,1 ἕως 0,2 ml τοῦ διαλύματος TMS. Μόνον ἡ καμπύλη τῆς χοληστερόλης πρέπει νά ἐμφανισθεῖ στό χρωματογράφημα.

Ρυθμίζουμε τήν εὐαισθησία ἔτσι ὥστε νά χρησιμοποιοῦμε περίπου ὅλη τήν κλίμακα τοῦ καταγραφέα.

4. *Δοκιμή ἀναλύσεως τῶν καμπυλῶν*

Λαμβάνουμε 5 ml τοῦ παρασκευασθέντος διαλύματος δοκιμῆς ἀναλύσεως τῶν καμπυλῶν. 'Εξατμίζουμε τό διαλύτη ἐνεργοῦντες ὅπως στήν παράγραφο 1.

'Ενίουμε 0,1 ἕως 0,2 ml τοῦ παρασκευασθέντος διαλύματος TMS.

Οἱ καμπύλες τῆς χοληστερόλης, τῆς θρασσικαστερόλης, τῆς καμπεστερόλης καί τῆς θ-σιτοστερόλης πρέπει νά ἐμφανίζονται στό χρωματογράφημα. Μετροῦμε τίς ἀποστάσεις κατακρατήσεως (ἀπόσταση μεταξύ τοῦ σημείου ἐνέσεως καί τοῦ σημείου μεγίστου ὕψους τῆς καμπύλης), τῶν καμπυλῶν, d_{CH} γιά χοληστερόλη, d_B γιά τήν θρασσικαστερόλη, d_C γιά τήν καμπεστερόλη καί d_S γιά τήν θ-σιτοστερόλη καί τά πλάτη τῶν κορυφῶν στίς θάσεις τους (μῆκος κατακρατήσεως μεταξύ τῶν σημείων τομῆς τῶν ἐφαπτομένων στά σημεῖα καμπῆς τῶν πλευρῶν τῶν καμπυλῶν μέ τή γραμμή θάσεως) ω_{CH} γιά τήν χοληστερόλη ω_B γιά τή θρασσικαστερόλη. 'Η ἀνάλυση τῶν καμπυλῶν, ἐκφραζόμενη μέ τόν τύπο

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

πρέπει νά ἔχει ἐλαχίστη τιμή 1.

'Υπολογίζουμε τούς σχετικούς χρόνους κατακρατήσεως (χοληστερόλη = 1,00) γιά τίς θρασσικαστερόλη, καμπεστερόλη καί θ-σιτοστερόλη.

5. *Τέστ συγκρίσεως*

Λαμβάνουμε 5 ml τοῦ διαλύματος συγκρίσεως, ἐξατμίζουμε τό διαλύτη, ἐνεργοῦντες ὅπως στήν παράγραφο 1, ἐνίουμε 0,1 ἕως 0,2 ml τοῦ παρασκευασθέντος διαλύματος TMS. Οἱ κορυφές τῆς καμπεστερόλης, στιγμαστερόλης, θ-σιτοστερόλης Δ 7 στιγμαστερόλης ἐμφανίζονται στό χρωματογράφημα.

Μετροῦμε τίς ἀποστάσεις κατακρατήσεως τῶν καμπυλῶν d_C γιά τήν καμπεστερόλη, d_{ST} γιά τή στιγμαστερόλη, d_S γιά τή θ-σιτοστερόλη, d_{ST-7} γιά τή Δ7-στιγμαστερόλη.

'Υπολογίζουμε τούς σχετικούς χρόνους κατακρατήσεως πού εἶναι κατά προσέγγιση:

cholesterol	1,0
brassicasterol	1,1
campesterol	1,3
stigmasterol	1,4
θ-sitosterol	1,6([1])
Δ7-stigmasterol	1,8([2])

6. *'Ανάλυση*

'Ενίουμε 0,1 ἕως 0,2 μl στερολικοῦ διαλύματος TMS τό ὁποῖο ἀναλύεται καί καταγράφεται τό χρωματογράφημα.

Δ. 'Έκφραση τῶν ἀποτελεσμάτων

Γιά τήν ἑρμηνεία τῆς συνθέσεως τοῦ ἀναλυθέντος κλάσματος στερολῶν, ἀγνοοῦμε κάθε κορυφή πού ἔχει χρόνο κατακρατήσεως διαφορετικό ἀπό ἐκείνους πού προσδιορίστηκαν πειραματικῶς γιά τίς ἕξη στερόλες πού ἀναφέρονται ἀνωτέρω.

'Η περιεκτικότης ἐπί τοῖς % σέ θ-σιτοστερόλη δίδεται ἀπό τόν τύπο:

$$\frac{\text{'Εμβαδόν καμπύλης τῆς θ-σιτοστερόλης}}{\text{"Αθροισμα τῶν ἐμβαδῶν τῶν ἕξι καμπυλῶν τῶν στερολῶν}} \times 100$$

'Η περιεχόμενη θ-σιτοστερόλη δέν πρέπει νά εἶναι κατώτερη τοῦ 93 % ἐν σχέσει πρός τή σύνθεση ἐπί τοῖς % τῶν συνολικῶν στερολῶν.

([1]) 'Εάν ἄλλαι στερόλαι ἔχουν, ὅπως ἡ Δ5-avenasterol, ὑπό τίς αὐτές συνθῆκες, τόν αὐτό ὄγκο κατακρατήσεως ὅπως ἡ θ-sitosterol, θεωροῦνται ὡς θ-sitosterol.

([2]) 'Εάν ἄλλες στερόλες ἔχουν ὑπό τίς αὐτές συνθῆκες τόν αὐτόν ὄγκο κατακρατήσεως ὅπως καί ἡ Δ7-stigmasterol, θεωροῦνται ὡς Δ7-stigmasterol.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IX

ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΣ ΣΕ ΕΛΑΙΟ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΠΥΡΗΝΩΝ

Ἐξοπλισμός

— κατάλληλη συσκευή ἐκχυλίσεως ἐφοδιασμένη μέ σφαιρική φιάλη τῶν 200 ἕως 250 ml,

— λουτρό ἠλεκτρικῆς θερμάνσεως (ἀμμόλουτρο, ὑδρόλουτρο κλπ.) ἤ θερμαινόμενη πλάκα,

— ἀναλυτικός ζυγός,

— φοῦρνος ρυθμισμένος στούς 80 °C τό μέγιστο,

— φοῦρνος ἠλεκτρικῆς θερμάνσεως ἐφοδιασμένος μέ θερμοστατικό μηχάνημα, ρυθμισμένος στούς 103 ± 2 °C μέ μηχανισμό ἐμφυσήσεως ἀέρος ἤ μειώσεως τῆς πιέσεως,

— μηχανικός μύλος, εὔκολα καθαριζόμενος πού νά ἐπιτρέπει τή σύνθλιψη, χωρίς νά ἐπιφέρει ἀνύψωση τῆς θερμοκρασίας ἤ αἰσθητή μεταβολή τῆς περιεκτικότητος σέ ὑγρασία καί ἔλαιο,

— δακτύλιος ἐκχυλίσεως καί ἐριοβάμβαξ ἤ διηθητικός χάρτης, ἀπαλλαγμένα συστατικῶν ἐκχυλιζομένων μέ τό ἑξάνιο,

— ξηραντήρ,

— κόσκινο διαμέτρου ὀπῶν 1 mm,

— μικρά τεμαχίδια ξηρανθείσης ἐλαφρόπετρας.

Ἀντιδραστήρια

Κανονικό ἑξάνιο (technical grade), τό ὁποῖο μετά ἀπό πλήρη ἐξάτμιση νά ἀφήνει ὑπόλειμμα τό πολύ 0,002 g ἀνά 100 ml.

ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Παρασκευή τοῦ δείγματος δοκιμῆς

Ἀλέθουμε τό ἐργαστηριακό δεῖγμα, ἐάν παρίσταται ἀνάγκη, μέ μηχανικό μύλο, καλά καθαρισμένο, ὥστε νά λάθουμε τεμάχια πού νά δύνανται νά διέλθουν ἀπό τό κόσκινο.

Χρησιμοποιοῦμε τό εἰκοστό περίπου τοῦ δείγματος γιά τόν πλήρη καθαρισμό τοῦ μύλου, ἀπορρίπτουμε τό ἄλεσμα αὐτό, ἀλέθουμε τήν ὑπόλοιπη ποσότητα, τή συλλέγουμε, τήν ἀναμιγνύουμε προσεκτικά καί τήν ἀναλύουμε ἀμέσως.

Ποσότης δοκιμῆς

Μόλις ὁλοκληρωθεῖ ἡ ἐργασία λειοτριβήσεως, ζυγίζουμε 10 g τοῦ δείγματος δοκιμῆς μέ ἀκρίβεια 0,01 g.

Προετοιμασία τῶν ἐκχυλιστικῶν δακτυλίων (cartouche)

Τοποθετοῦμε τό δεῖγμα δοκιμῆς ἐντός τοῦ δακτυλίου καί πωματίζουμε μέ ἐριοβάμβακα. Ἄν χρησιμοποιεῖται διηθητικός χάρτης, τό ἄλεσμα τυλίγεται μέσα σ' αὐτό.

Προκαταρκτική ξήρανση

Ἄν ὁ ἐλαιοπυρήνας εἶναι πολύ ὑγρός (π.χ. περιεκτικότητα σέ ὑγρασία καί πτητικές ὕλες ἄνω τοῦ 10 %), ξηραίνουμε αὐτόν προκαταρκτικῶς διά τοποθετήσεως τοῦ ἑτοίμου δακτυλίου (ἤ τοῦ διηθητικοῦ χάρτου) ἐπί τι χρονικό διάστημα μέσα σέ φοῦρνο θερμανθέντα σέ θερμοκρασία ὄχι ἀνώτερη τῶν 80 °C γιά νά ἐλαττώσουμε τήν περιεκτικότητα σέ ὑγρασία καί πτητικές ὕλες κάτω τοῦ 10 %.

Προετοιμασία τῆς σφαιρικῆς φιάλης

Ζυγίζουμε, μέ ἀκρίβεια 1 mg, φιάλη περιέχουσα ἕνα ἤ δύο τεμαχίδια ἐλαφρόπετρας, προηγουμένως ξηρανθείσα μέσα σέ φοῦρνο στούς 103 ± 2 °C καί ἐν συνεχεία ψυχθείσα μέσα σέ ξηραντήρα γιά διάστημα τουλάχιστον μίας ὥρας.

Πρώτη ἐκχύλιση

Μέσα στή συσκευή ἐκχυλίσεως εἰσάγουμε τό δακτύλιο (ἤ τό διηθητικό χάρτη) πού περιέχει τήν ποσότητα δοκιμῆς. Χύνουμε ἐντός τῆς σφαιρικῆς φιάλης τήν ἀπαραίτητη ποσότητα ἑξανίου. Συνδέουμε τή φιάλη μέ τή συσκευή ἐκχυλίσεως καί τό σύνολο τοποθετεῖται στό ἠλεκτρικά θερμαινόμενο λουτρό. Ρυθμίζουμε τή θέρμανση κατά τέτοιο τρόπο ὥστε ἡ ταχύτης ἐπαναρροῆς νά εἶναι τουλάχιστον 3 σταγόνες τό δευτερόλεπτο (θρασμός μέτριος ὄχι ἰσχυρός). Μετά τέσσερις ὧρες ἐκχυλίσεως ψύχουμε. Ἀπομακρύνουμε τό δακτύλιο ἀπό τή συσκευή ἐκχυλίσεως καί τό θέτουμε σέ ρεῦμα ἀέρος γιά νά ἀπομακρύνουμε τόν ἐμποτισθέντα διαλύτη.

Δεύτερη ἐκχύλιση

Ἀδειάζουμε τό δακτύλιο ἐντός μικρο-ἀλεστῆρος καί ἀλέθουμε σέ ὅσο τό δυνατό λεπτότερα τεμάχια. Ἐπαναφέρουμε τό μίγμα πάλι μέσα στό δακτύλιο ποσοτικά καί τοποθετοῦμε τό δακτύλιο μέσα στή συσκευή ἐκχυλίσεως.

Συνεχίζουμε τήν ἐκχύλιση γιά δύο ἐπί πλέον ὧρες, χρησιμοποιώντας τήν ἴδια σφαιρική φιάλη πού περιέχει τό πρῶτο ἐκχύλισμα.

Τό λαμβανόμενο στή φιάλη ἐκχυλίσεως διάλυμα πρέπει νά εἶναι διαυγές. Ἂν δέν εἶναι, τό διηθοῦμε μέ διηθητικό χάρτη καί ξεπλένουμε τήν ἀρχική φιάλη καί τό διηθητικό χάρτη ἀρκετές φορές μέ ἐξάνιο. Συλλέγουμε τό διήθημα καί τό διαλύτη τῆς πλύσεως ἐντός δευτέρας σφαιρικῆς φιάλης, ἡ ὁποία ἔχει προηγουμένως ξηρανθεῖ καί ζυγισθεῖ μέ ἀκρίβεια 1 mg.

Ἀπομάκρυνση τοῦ διαλύτου καί ζύγιση τοῦ ἐκχυλίσματος

Ἀπομακρύνουμε τό μεγαλύτερο μέρος τοῦ διαλύτου δι' ἀποστάξεως ἐπί ἠλεκτρικῶς θερμαινομένου λουτροῦ. Ἀπομακρύνουμε τά τελευταῖα ἴχνη τοῦ διαλύτου θερμαίνοντας τή φιάλη μέσα σέ φοῦρνο στούς 103 ° ± 2 °C γιά 20 λεπτά. Διευκολύνουμε τήν ἀπομάκρυνση αὐτή εἴτε δι' ἐμφυσήσεως, κατά διαλείμματα ἀέρος, ἤ προτιμότερο ἀδρανοῦς ἀερίου εἴτε διά μειώσεως τῆς πιέσεως.

Ἀφήνουμε τή φιάλη νά ψυχθεῖ μέσα σέ ξηραντήρα ἐπί μία τουλάχιστον ὥρα καί ζυγίζουμε μέ ἀκρίβεια 1 mg.

Θερμαίνουμε ἐκ νέου γιά 10 λεπτά μέ τίς ἴδιες συνθῆκες, ψύχουμε μέσα στόν ξηραντήρα καί ζυγίζουμε.

Ἡ διαφορά μεταξύ τῶν δύο ζυγίσεων δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τά 10 mg. Ἂν ὄχι θερμαίνουμε ἐκ νέου γιά διάστημα 10 λεπτῶν, ψύχουμε καί ζυγίζουμε, ἐπαναλαμβάνοντας τήν ἐργασία μέχρις ὅτου ἡ διαφορά βάρους μεταξύ δύο ζυγίσεων νά μήν εἶναι μεγαλύτερη ἀπό 10 mg. Λαμβάνουμε ὑπόψη τήν τελευταία ζύγιση τῆς φιάλης.

Ἐκτελοῦμε δύο προσδιορισμούς ἐπί τοῦ αὐτοῦ δείγματος δοκιμῆς.

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τρόπος ὑπολογισμοῦ καί τύπος

α) Τό ἐκχύλισμα ἐκπεφρασμένο ἐπί τοῖς ἑκατό κατά μάζα τοῦ προϊόντος ὡς ἔχει, ἰσοῦται μέ:

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

ὅπου S εἶναι τό ποσοστό ἐπί τοῖς % κατά μάζα τοῦ ἐκχυλίσματος τοῦ προϊόντος ὡς ἔχει,

m_0 εἶναι ἡ μάζα, σέ γραμμάρια, τῆς ποσότητος δοκιμῆς,

m_1 εἶναι ἡ μάζα, σέ γραμμάρια, τοῦ ἐκχυλίσματος μετά τήν ξήρανση.

Λαμβάνουμε ὡς ἀποτέλεσμα τόν ἀριθμητικό μέσο ὅρο τῶν δύο προσδιορισμῶν ἐφ' ὅσον πληροῦνται οἱ προϋποθέσεις ἐπαναληπτικότητος.

Ἐκφράζουμε τό ἀποτέλεσμα μέ ἕνα δεκαδικό ψηφίο.

β) Τό ἐκχύλισμα ἀνάγεται ἐπί ξηρᾶς οὐσίας μέ τόν ἀκόλουθο τύπο:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{ἐκχύλισμα ἐπί τοῖς ἑκατό λιπαρό/ξηρό}$$

ὅπου S εἶναι τό ποσοστό κατά μάζα τοῦ ἐκχυλίσματος τοῦ προϊόντος ὡς ἔχει (βλέπε α).

U εἶναι ἡ περιεκτικότης σέ ὑγρασία καί πτητικές ὕλες.

Ἐπαναληπτικότης

Ἡ διαφορά μεταξύ τῶν ἀποτελεσμάτων τῶν δύο προσδιορισμῶν, οἱ ὁποῖοι πραγματοποιοῦνται συγχρόνως ἤ ταχέως ὁ ἕνας μετά τόν ἄλλο ἀπό τόν ἴδιο ἀναλυτή, δέν πρέπει νά ὑπερβαίνει τά 0,2 g ἐκχυλίσματος ἐξανίου ἀνά 100 g δείγματος.

Σέ ἀντίθετη περίπτωση, ἐπαναλαμβάνουμε τήν ἀνάλυση μέ δύο ἄλλες ποσότητες δοκιμῆς. Ἂν καί πάλι ἡ διαφορά ὑπερβαίνει τά 0,2 g λαμβάνουμε ὡς ἀποτέλεσμα τόν ἀριθμητικό μέσο ὅρο τῶν τεσσάρων πραγματοποιηθέντων προσδιορισμῶν.