ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΟΣ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2019/1604 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 27ης Σεπτεμβρίου 2019

για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 σχετικά με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων καθώς και με τις μεθόδους προσδιορισμού

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη τον κανονισμό (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 ([1]), και ιδίως το άρθρο 91 πρώτο εδάφιο στοιχείο δ),

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

(1) Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 της Επιτροπής ([2]) ορίζει τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων, καθώς και τις μεθόδους αξιολόγησης των χαρακτηριστικών αυτών.

(2) Οι εν λόγω μέθοδοι και οι οριακές τιμές για τα χαρακτηριστικά των ελαιολάδων επικαιροποιούνται τακτικά με βάση τη γνωμοδότηση των χημικών εμπειρογνωμόνων και σε συμφωνία με το έργο που επιτελείται στο πλαίσιο του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαίας (ΔΣΕ).

(3) Προκειμένου να διασφαλιστεί η εφαρμογή σε ενωσιακό επίπεδο των πιο πρόσφατων διεθνών προτύπων του ΔΣΕ, θα πρέπει να επικαιροποιηθούν ορισμένες μέθοδοι ανάλυσης που προβλέπονται στον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91.

(4) Το πρότυπο εμπορίου του ΔΣΕ τροποποιήθηκε όσον αφορά την έκφραση του ορίου της ελεύθερης οξύτητας, τον αριθμό υπεροξειδίων, την οργανοληπτική εξέταση (διάμεση τιμή των ελαττωμάτων και διάμεση τιμή της ιδιότητας του φρουτώδους) και τη διαφορά μεταξύ ECN42 (HPLC) και ECN42 (θεωρητικός υπολογισμός) για λόγους συνέπειας με τις τιμές πιστότητας της μεθόδου ανάλυσης.

(5) Σύμφωνα με το άρθρο 2α παράγραφος 5 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91, τα κράτη μέλη εξακριβώνουν κατά πόσον ένα δείγμα ελαιολάδου είναι σύμφωνο με τη δηλωθείσα κατηγορία μέσω ελέγχου των χαρακτηριστικών που παρατίθενται στο παράρτημα I του εν λόγω κανονισμού, είτε με οποιαδήποτε σειρά είτε σύμφωνα με τη σειρά που προβλέπεται στο διάγραμμα αποφάσεων που παρατίθεται στο παράρτημα Ιβ του ίδιου κανονισμού.

(6) Λαμβανομένων υπόψη των πρόσφατων εξελίξεων, είναι σκόπιμο να επικαιροποιηθούν οι πίνακες του παραρτήματος Ιβ του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 και το προσάρτημά του, ανάλογα με την περίπτωση. Φαίνεται επίσης ότι ο όρος «διάγραμμα ροής» είναι καταλληλότερος από τον όρο «διάγραμμα αποφάσεων», λαμβανομένου υπόψη του περιεχομένου του εν λόγω παραρτήματος Ιβ.

(7) Στο σημείο 9.4 του παραρτήματος XII του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91, η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων ορίζεται ως η διάμεση τιμή του ελαττώματος που γίνεται αντιληπτό με τη μεγαλύτερη ένταση. Στο πλαίσιο των κατ' έφεση εξετάσεων και δεδομένου ότι οι διάφορες ομάδες δοκιμαστών πρέπει να εκτιμήσουν τη συμμόρφωση του ελαίου, θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι η απόφαση σχετικά με τη συμμόρφωση των χαρακτηριστικών του ελαίου με τη δηλωθείσα κατηγορία συνδέεται αποκλειστικά με τη διάμεση τιμή του κύριου ελαττώματος, ανεξαρτήτως της φύσης του.

(8) Συνεπώς, ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 θα πρέπει να τροποποιηθεί αναλόγως.

(9) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής για την κοινή οργάνωση των γεωργικών αγορών,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 τροποποιείται ως εξής:

1) το άρθρο 2 τροποποιείται ως εξής:

α) στην παράγραφο 1, το στοιχείο ιβ) αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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»·

([1]) ΕΕ L 347 της 20.12.2013, σ. 671.

([2]) Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 της Επιτροπής, 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).

β) στην παράγραφο 2, το τρίτο εδάφιο αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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.»·

2) στο άρθρο 2α παράγραφος 5, το στοιχείο β) αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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.»·

3) ο πίνακας «ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ Σύνοψη» αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος I του παρόντος κανονισμού·

4) το παράρτημα I αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος II του παρόντος κανονισμού·

5) το σημείο 2.1 του παραρτήματος Ια αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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 εμφαίνεται στο διάγραμμα ροής του παραρτήματος Ιβ ή με οποιαδήποτε άλλη τυχαία σειρά.»·

6) το παράρτημα Ιβ αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος III του παρόντος κανονισμού·

7) το παράρτημα V απαλείφεται·

8) το σημείο 4.2 του παραρτήματος VII αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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.»·

9) το παράρτημα XII τροποποιείται σύμφωνα με το παράρτημα IV του παρόντος κανονισμού·

10) το παράρτημα XVII τροποποιείται σύμφωνα με το παράρτημα V του παρόντος κανονισμού·

11) το παράρτημα XVIII τροποποιείται σύμφωνα με το παράρτημα VI του παρόντος κανονισμού·

12) το παράρτημα XIX αντικαθίσταται από το κείμενο του παραρτήματος VII του παρόντος κανονισμού·

13) το σημείο 4.2 του παραρτήματος XX αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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 περισσότερος 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.».

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

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

Βρυξέλλες, 27 Σεπτεμβρίου 2019.

Για την Επιτροπή

Ο Πρόεδρος

Jean-Claude JUNCKER

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΣΎΝΟΨΗ

Παράρτημα I	Χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου
Παράρτημα Ια	Δειγματοληψία ελαιόλαδου ή πυρηνέλαιου που παραδίδονται σε άμεσες συσκευασίες
Παράρτημα Ιβ	Διάγραμμα ροής για την εξακρίβωση της συμφωνίας ενός δείγματος ελαιόλαδου με τη δηλωθείσα κατηγορία
Παράρτημα II	Προσδιορισμός των ελεύθερων λιπαρών οξέων, εν ψυχρώ 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 II

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

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 (%)	Στιγμασταδιένια (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 αποτελούμενο από εξευγενισμένο 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 %
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 (%)	Βρασικαστερόλη (%)	Καμπεστερόλη (1) (%)	Στιγμαστερόλη (%)	Φαινόμενη β-σιτοστερόλη (2) (%)	δ-7-στιγμαστενόλη (1) (%)			
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Μειονεκτικό ελαιόλαδο (λαμπάντε)	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (3)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ (3)
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
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:

α) Τα αποτελέσματα των αναλύσεων πρέπει να εκφράζονται με τον αριθμό δεκαδικών ψηφίων που προβλέπεται για κάθε χαρακτηριστικό. Το τελευταίο αριθμητικό ψηφίο πρέπει να αυξάνεται κατά μία μονάδα, εάν το επόμενο ψηφίο είναι μεγαλύτερο από 4.

β) Αρκεί έστω και ένα χαρακτηριστικό να μην ανταποκρίνεται στις αναγραφόμενες τιμές για να καταταχθεί το ελαιόλαδο σε άλλη κατηγορία ή να χαρακτηριστεί μη σύμφωνο για τους σκοπούς του παρόντος κανονισμού.

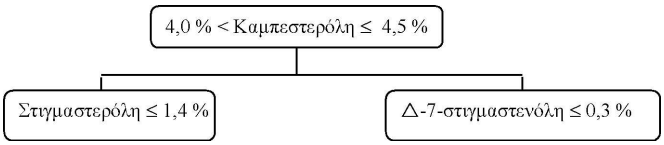
γ) Για το μειονεκτικό ελαιόλαδο, και τα δύο χαρακτηριστικά ποιότητας που σημειώνονται με αστερίσκο (*) μπορούν να διαφέρουν συγχρόνως από τα όρια που έχουν καθοριστεί για τη συγκεκριμένη κατηγορία.

δ) 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.

Προσάρτημα

Δενδροδιαγράμματα αποφάσεων

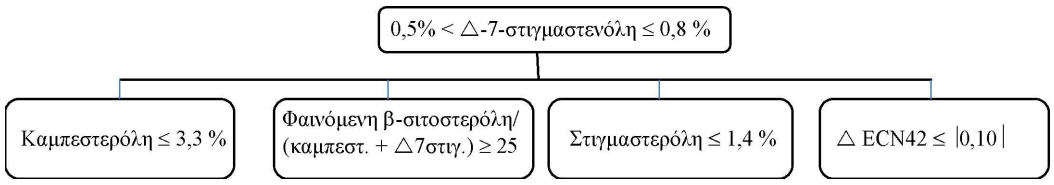
Δενδροδιάγραμμα αποφάσεων σχετικά με την **καμπεστερόλη** για παρθένα και εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα:



Οι άλλες παράμετροι συμμορφώνονται με τα όρια του παρόντος κανονισμού.

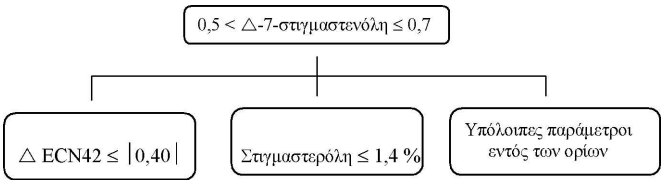
Δενδροδιάγραμμα αποφάσεων σχετικά με τη **Δ-7-στιγμαστενόλη** για:

— Εξαιρετικά παρθένα και παρθένα ελαιόλαδα



Οι άλλες παράμετροι συμμορφώνονται με τα όρια του παρόντος κανονισμού.

— Πυρηνέλαια (ακατέργαστα και εξευγενισμένα)



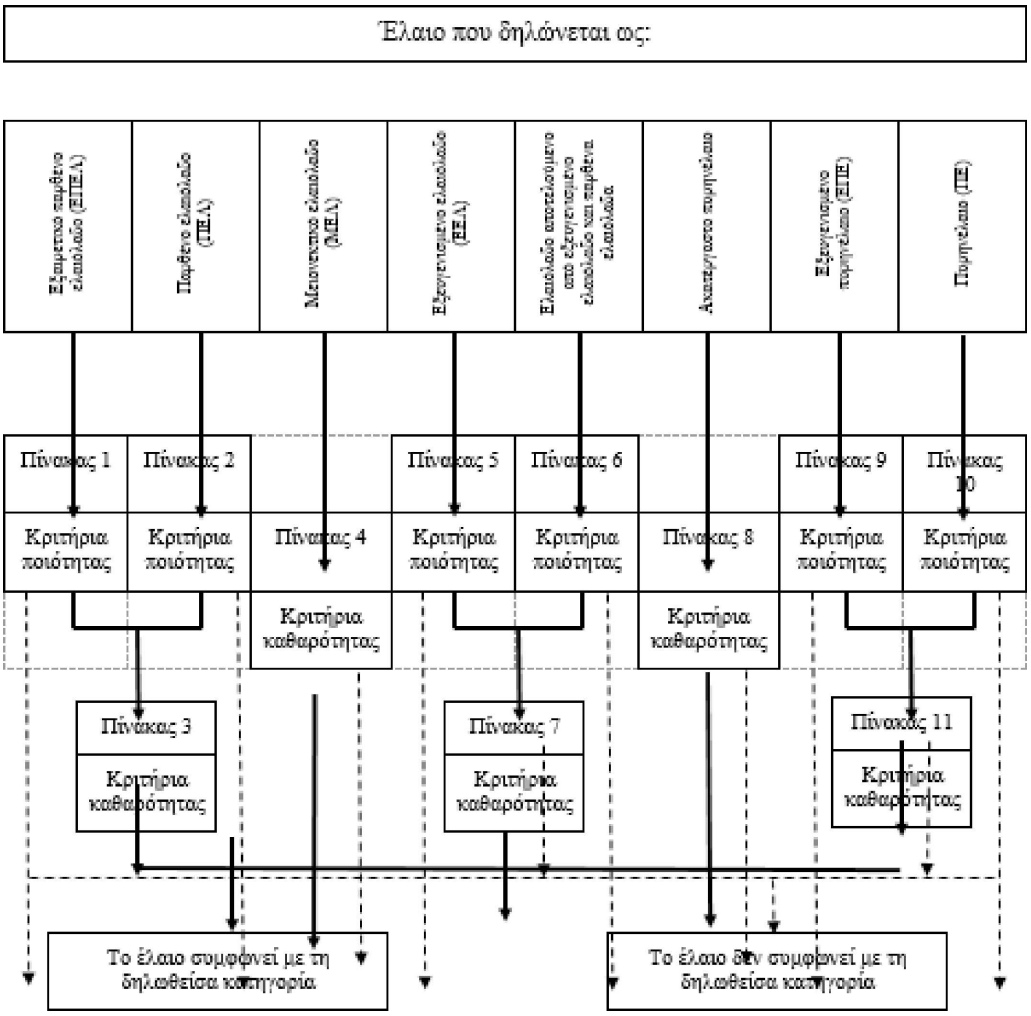
Οι άλλες παράμετροι συμμορφώνονται με τα όρια του παρόντος κανονισμού.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

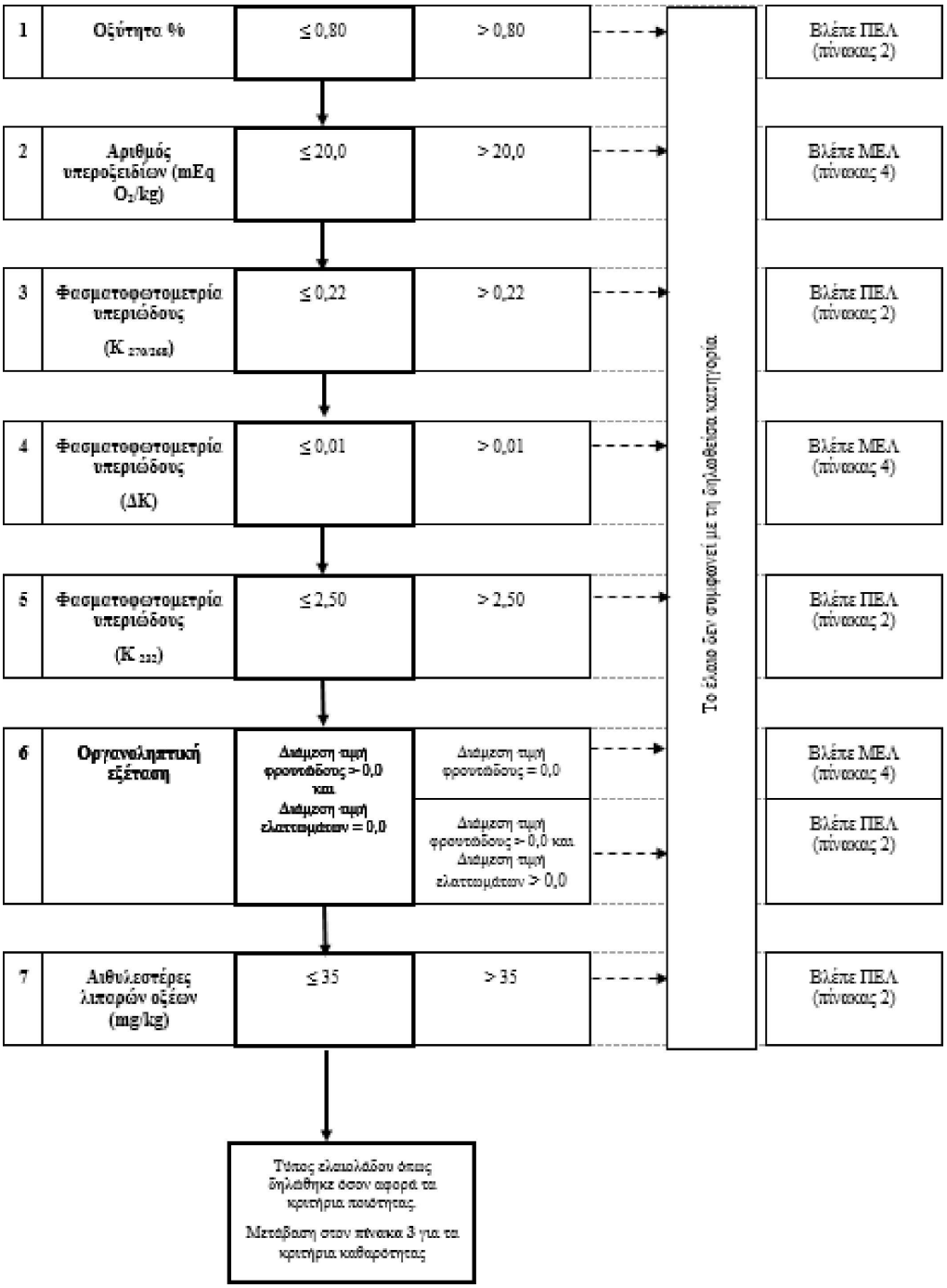
«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ιβ

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

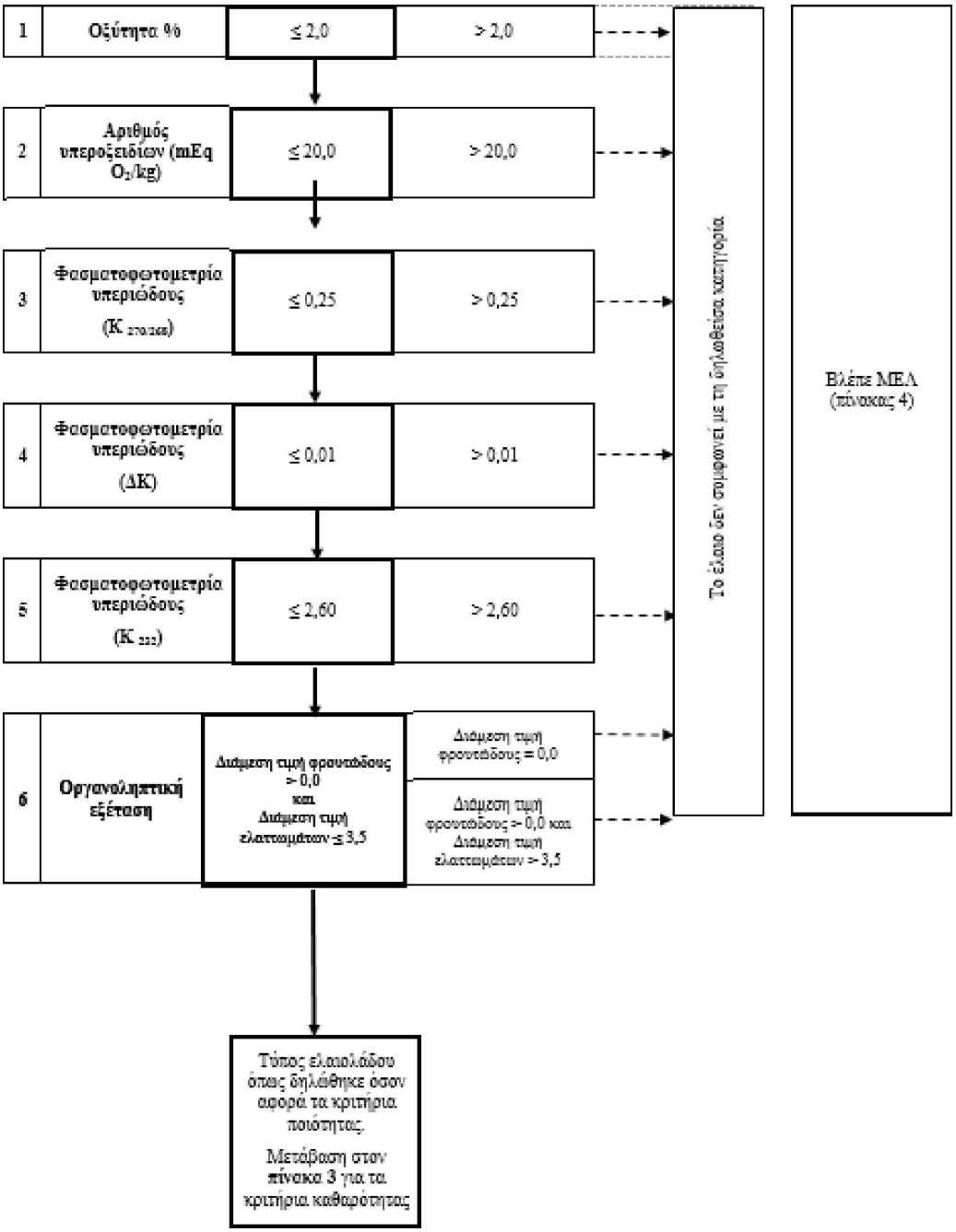
Γενικός πίνακας



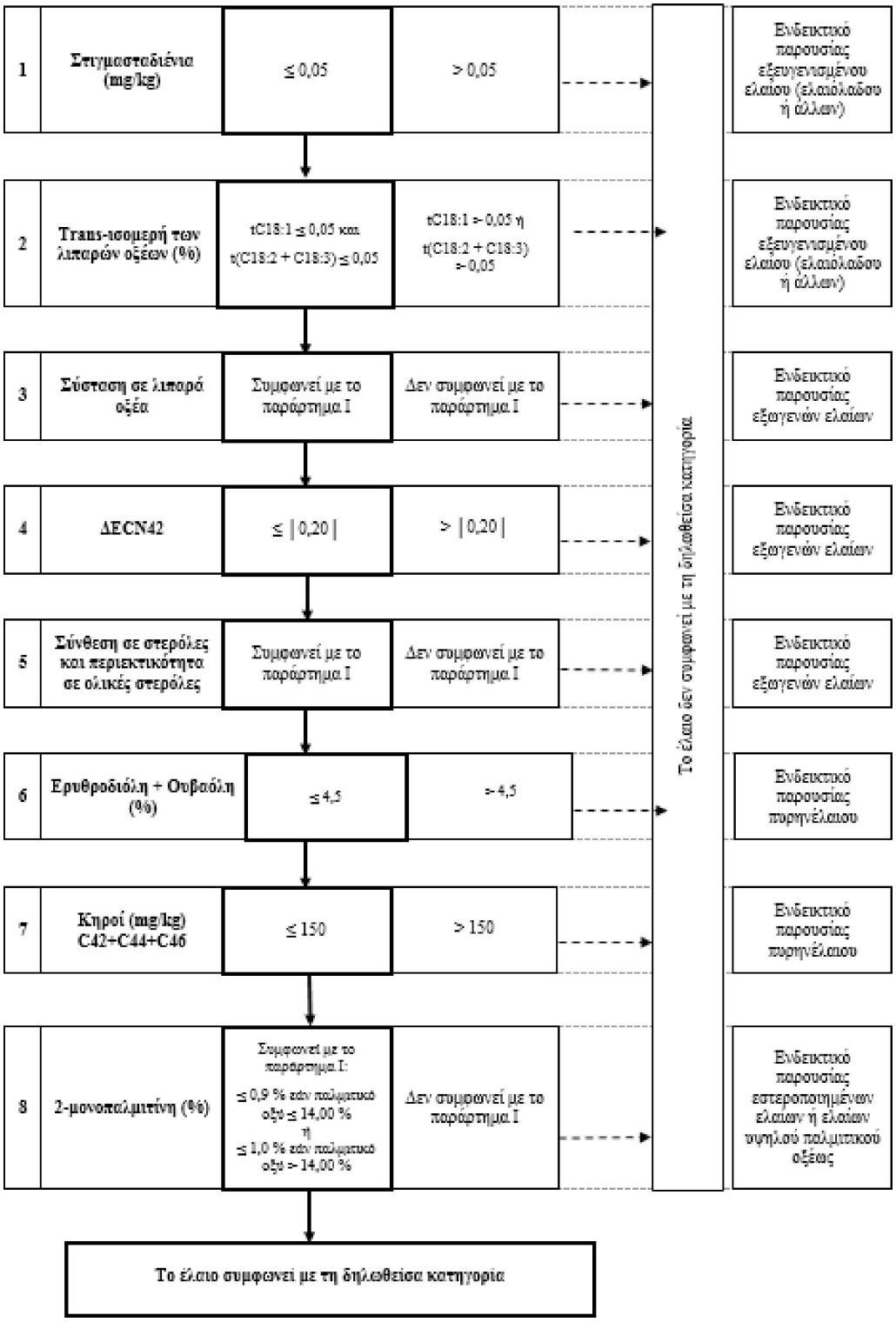
Πίνακας 1 — Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο — Κριτήρια ποιότητας



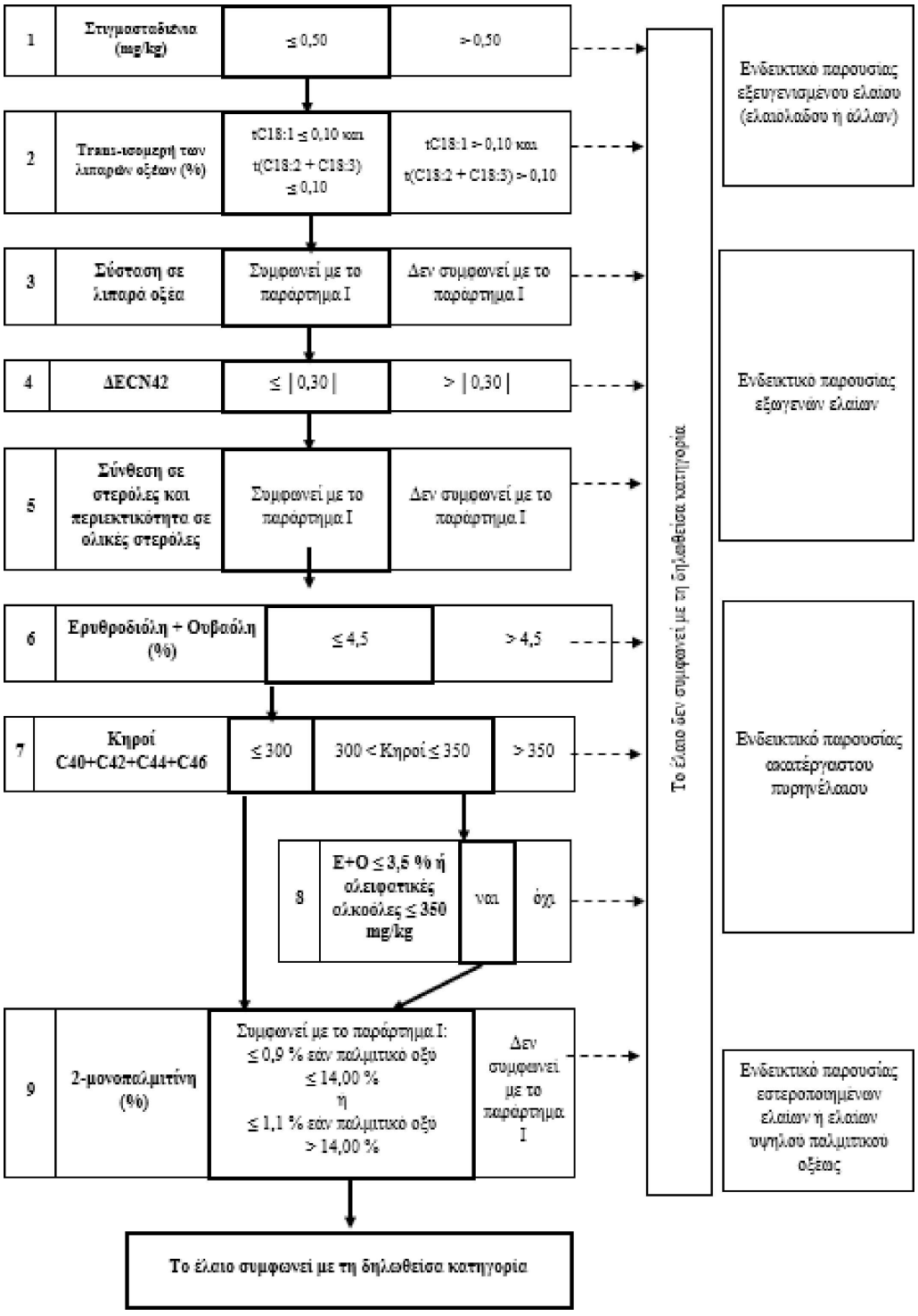
Πίνακας 2 — Παρθένο ελαιόλαδο — Κριτήρια ποιότητας



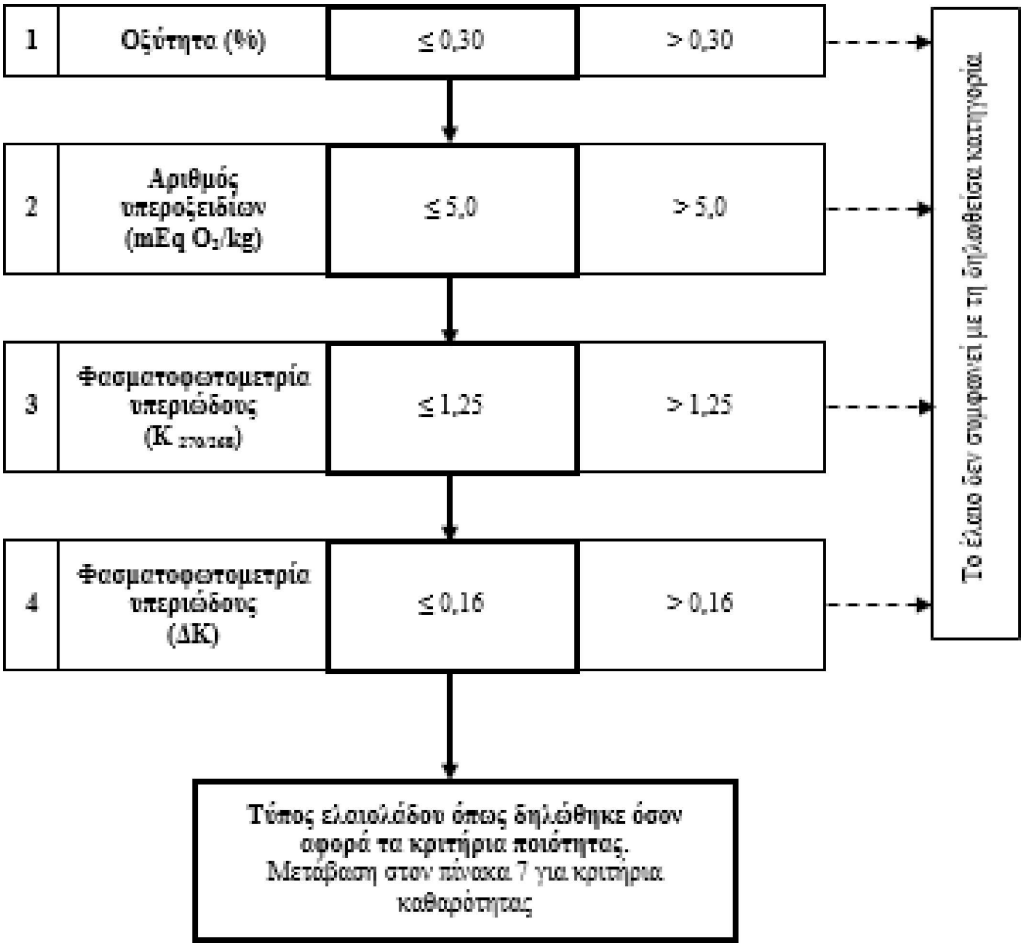
Πίνακας 3 — Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και παρθένο ελαιόλαδο — Κριτήρια καθαρότητας



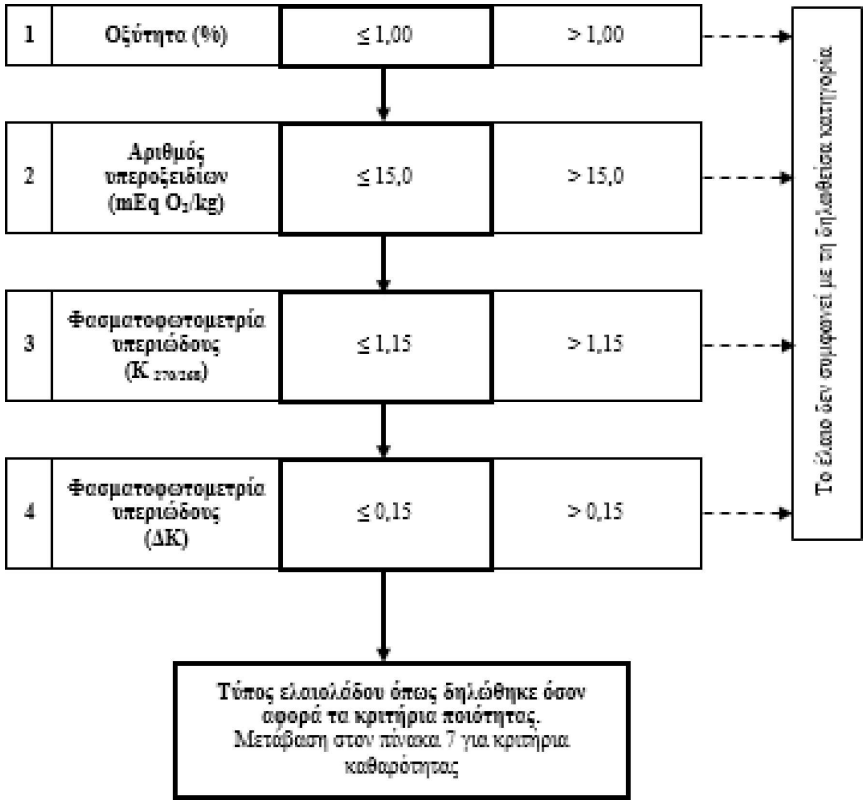
Πίνακας 4 — Μειονεκτικό ελαιόλαδο — Κριτήρια καθαρότητας



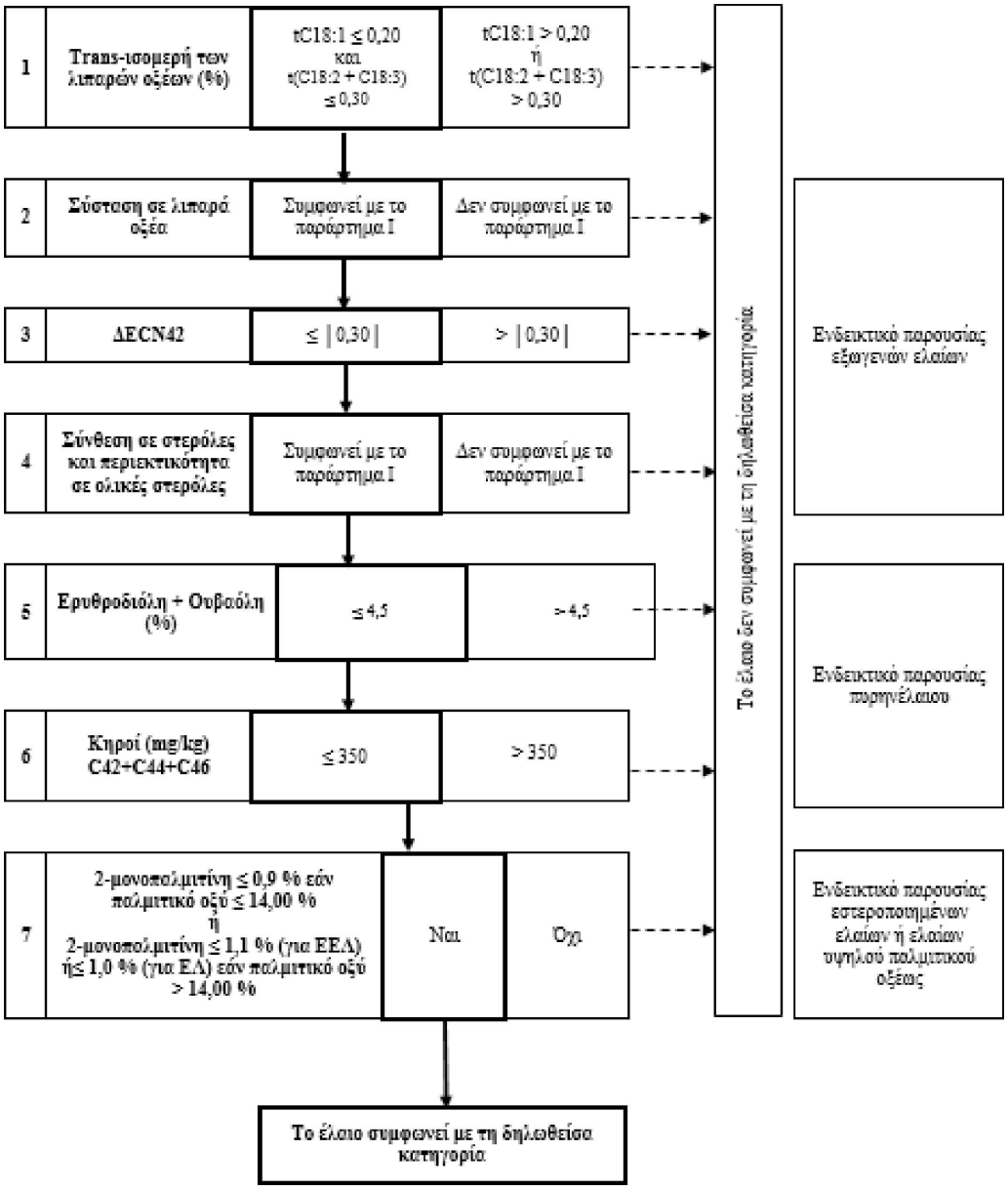
Πίνακας 5 — Εξευγενισμένο ελαιόλαδο — Κριτήρια ποιότητας



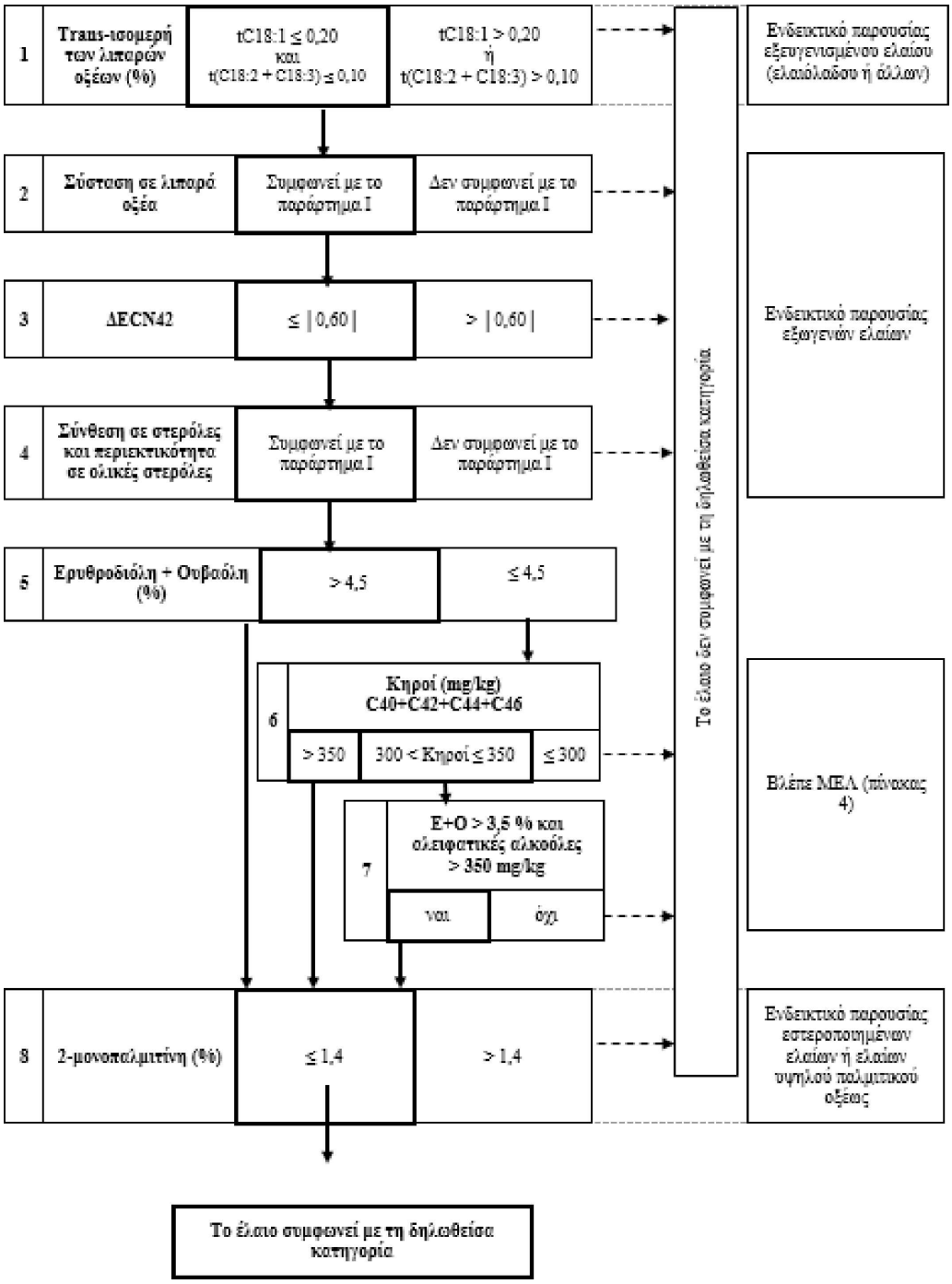
Πίνακας 6 — Ελαιόλαδο (αποτελούμενο από εξευγενισμένο ελαιόλαδο και παρθένα ελαιόλαδα) — Κριτήρια ποιότητας



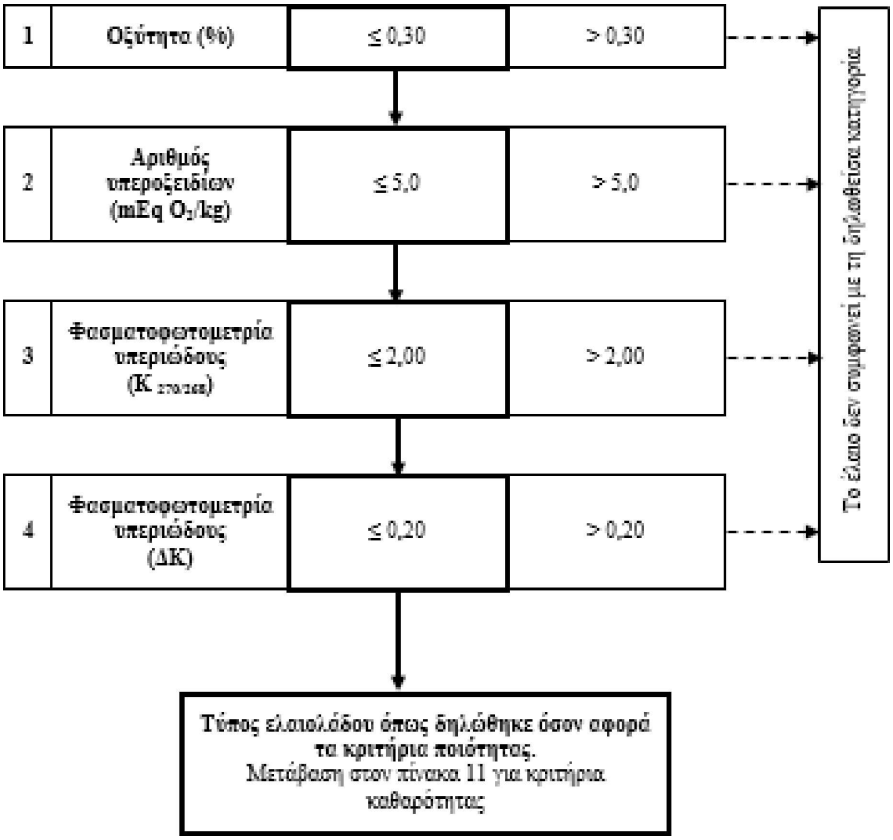
Πίνακας 7 — Εξευγενισμένο ελαιόλαδο και ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένο ελαιόλαδο και παρθένα ελαιόλαδα — Κριτήρια καθαρότητας



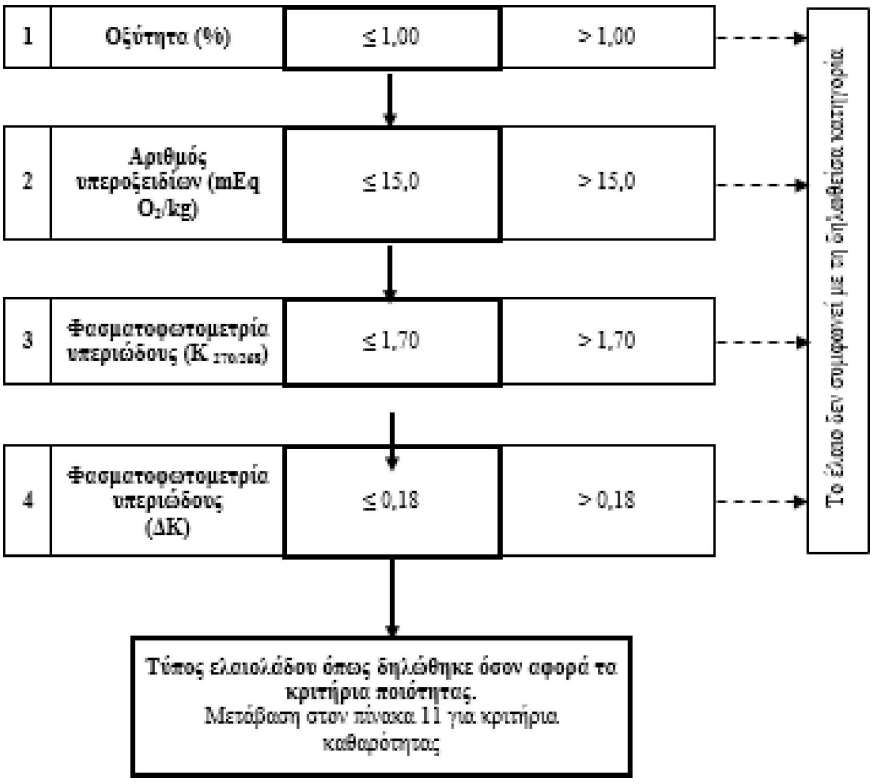
Πίνακας 8 — Ακατέργαστο πυρηνέλαιο — Κριτήρια καθαρότητας



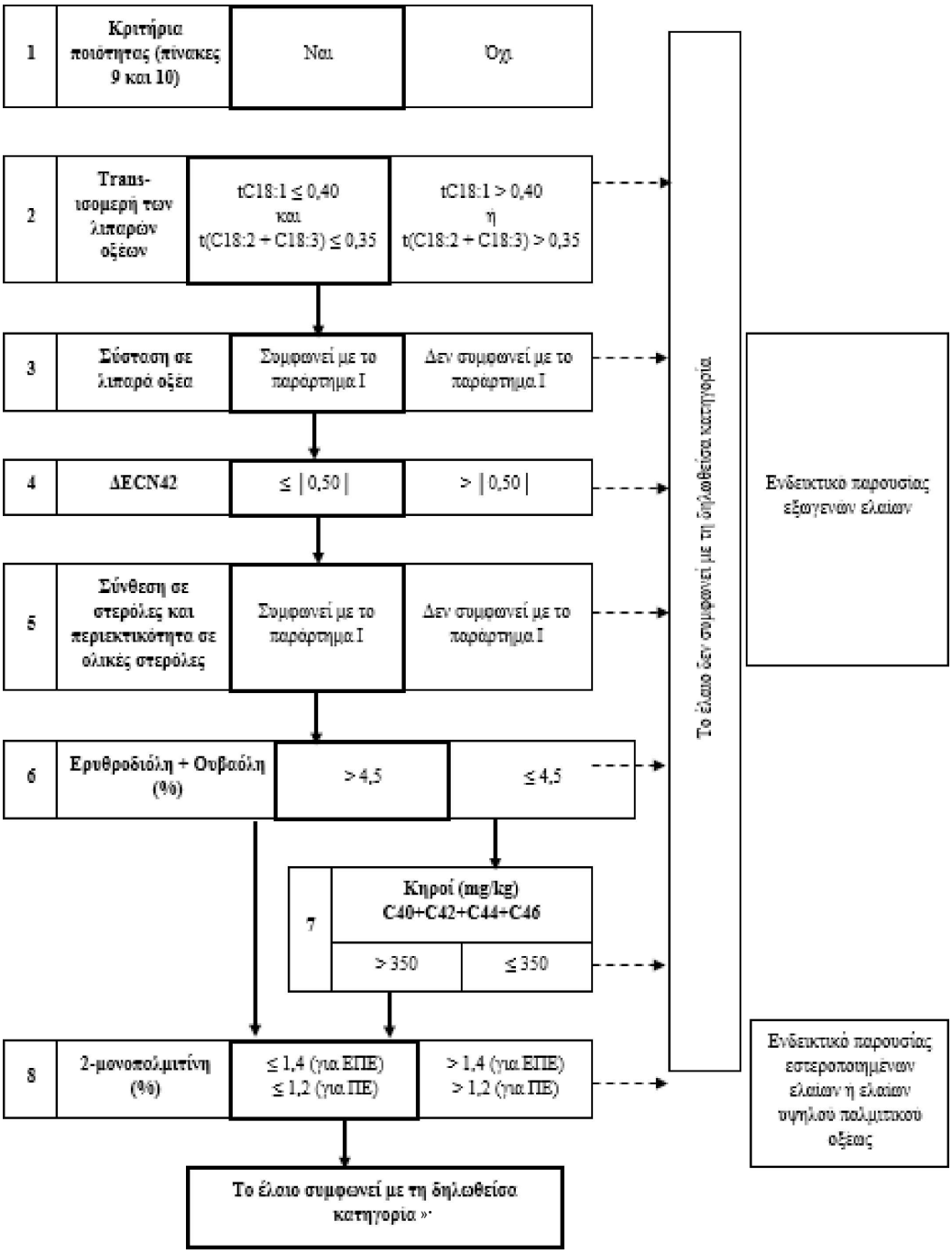
Πίνακας 9 — Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο — Κριτήρια ποιότητας



Πίνακας 10 — Πυρηνέλαιο — Κριτήρια ποιότητας



Πίνακας 11 — Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο και πυρηνέλαιο — Κριτήρια καθαρότητας



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Το παράρτημα XII τροποποιείται ως εξής:

1. το σημείο 3.3 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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.

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.

Φρουτώδες	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.
Άγουρο φρουτώδες	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.
Ώριμο φρουτώδες	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.
Ισορροπημένο	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.
Ήπιο ελαιόλαδο	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 (Δτ) της ιδιότητας
Φρουτώδες	—
Ώριμο φρουτώδες	—
Άγουρο φρουτώδες	—
Απαλό φρουτώδες	≤ 3,0
Μέτριο φρουτώδες	3,0 < Δτ ≤ 6,0
Έντονο φρουτώδες	> 6,0
Απαλό ώριμο φρουτώδες	≤ 3,0
Μέτριο ώριμο φρουτώδες	3,0 < Δτ ≤ 6,0
Έντονο ώριμο φρουτώδες	> 6,0
Απαλό άγουρο φρουτώδες	≤ 3,0
Μέτριο άγουρο φρουτώδες	3,0 < Δτ ≤ 6,0
Έντονο άγουρο φρουτώδες	> 6,0

Όροι που υπόκεινται στην προσκόμιση πιστοποιητικού οργανοληπτικής εξέτασης	Διάμεση τιμή (Δτ) της ιδιότητας
Απαλό πικρό	≤ 3,0
Μέτριο πικρό	3,0 < Δτ ≤ 6,0
Έντονο πικρό	> 6,0
Απαλό πικάντικο	≤ 3,0
Μέτριο πικάντικο	3,0 < Δτ ≤ 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.»

2. το σημείο 9.4 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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.

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 γευσιγνωστικής 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 διάμεσων τιμών.».

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

Το παράρτημα XVII τροποποιείται ως εξής:

1. το σημείο 5.1 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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.»·

2. στο σημείο 6.3.3, προστίθεται το ακόλουθο κείμενο:

«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.».

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

Το παράρτημα XVIII τροποποιείται ως εξής:

1. το σημείο 4.2.1 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«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.»·

2. προστίθεται το ακόλουθο σημείο 4.2.12:

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

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ XIX

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΣΤΕΡΟΛΕΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ 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 τριμεθυλοσιλυλαιθέρες 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 εσμυρισμένους 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 εσμυρισμένο κωνικό σύνδεσμο (αρσενικό).

3.6. Κωνική φιάλη των 50 ml, με εσμυρισμένο 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 πώμα ασφαλείας.

3.8. Ξηραντήρας με χλωριούχο ασβέστιο.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

4.1. Υδροξείδιο του καλίου τίτλου τουλάχιστον 85 %.

4.2. Αιθανολικό διάλυμα υδροξείδιου 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 αμφότερων 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 ± 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 υδροξείδιου 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).

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 εσμυρισμένο κωνικό σύνδεσμο (αρσενικό).

3.5. Κωνική φιάλη των 50 ml, με εσμυρισμένο 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. Δυαδική 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.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

4.1. Υδροξείδιο του καλίου τίτλου τουλάχιστον 85 %.

4.2. Αιθανολικό διάλυμα υδροξείδιου 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 (4.9). 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 υδροξειδίου 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-διχλωροφλουορεσκεΐνης 0,2 % σε αιθανολικό διάλυμα. Το διάλυμα καθίσταται ελαφρώς αλκαλικό με την προσθήκη μερικών σταγόνων αλκοολικού διαλύματος υδροξειδίου 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 υδροξειδίου 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–αιθυλεθέρα 50:50 (V/V).

Παρασκευάζεται διάλυμα περίπου 5 % ασαπωνοποίητων 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.

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 έκλουση 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 αναμιγνύεται 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 προζυγισμένο 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 ασαπωνοποίητες 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 ασαπωνοποίητων 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.

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 τριμεθυλοσιλυλαιθέρες 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 υπερσιλανιωμένο 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 σιλυλίωσης, το οποίο είναι μείγμα πυριδίνης/εξαμεθυλοδισιλαζανίου/τριμεθυλοχλωροσιλανίου 9:3:1 (V/V/V).

4.9. n-εξάνιο, χρωματογραφικής καθαρότητας.

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 χιλιοστόγραμμο 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 προηγείται 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:

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
Εγχυόμενος 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
Εγχυόμενος 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, αναρροφάται 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.

Εκτελείται καταγραφή μέχρι πλήρους έκλουσης των TMSE των αντίστοιχων υπαρχουσών αλκοολούχων ενώσεων. Η γραμμή βάσης 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 εκλούονται 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 εκλούονται με την ακόλουθη σειρά: χοληστερόλη, βρασικαστερόλη, εργοστερόλη, 24-μεθυλενο-χοληστερόλη, 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:

$$Αλκοολούχος\ ένωση\ x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

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.

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

$$Στερόλη\ x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

όπου:

A_x = εμβαδόν της κορυφής της στερόλης x.

ΣΑ = 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:

$$Ερυθροδιόλη + \ Ουβαόλη = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

όπου:

A_{Er} = εμβαδόν της κορυφής της ερυθροδιόλης, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

A_{Uv} = εμβαδόν της κορυφής της ουβαόλης, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

Σ_{AT} = 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:

$$Ερυθροδιόλη = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$Ουβαόλη = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

όπου:

A_{Er} = εμβαδόν της κορυφής της ερυθροδιόλης, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

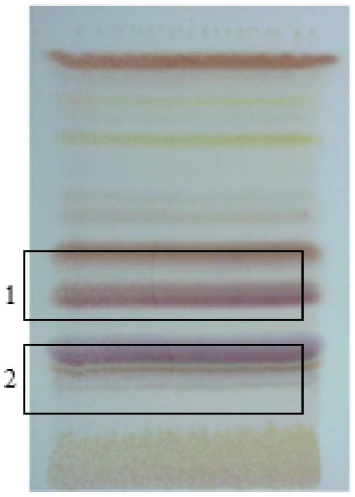
A_{Uv} = εμβαδόν της κορυφής της ουβαόλης, σε μονάδες υπολογιστικού συστήματος.

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.

Προσάρτημα



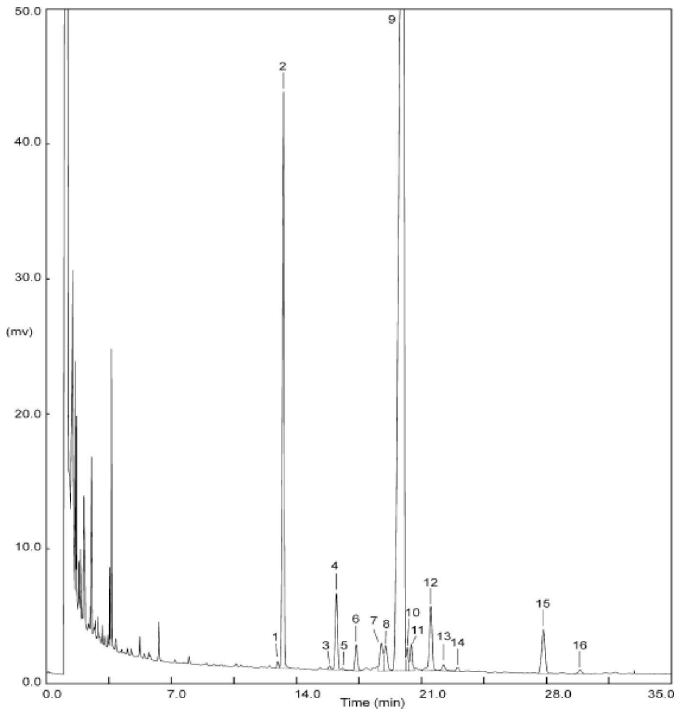
1 Υδρογονάνθρακες
2 α-Τοκοφερόλη
3 Πρενόλες
4 Τριτερπενικές αλκοόλες
5 Αλειφατικές αλκοόλες
6 Μεθυλικές στερόλες
7 Στερόλες
8 Τριτερπενικές διαλκοόλες

Σχήμα 1 — Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας του κλάσματος ασαπωνοποίητων 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 παραλληλόγραμμο: 1 είναι οι ζώνες για τις αλειφατικές αλκοόλες και 2 οι ζώνες για τις στερόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες.

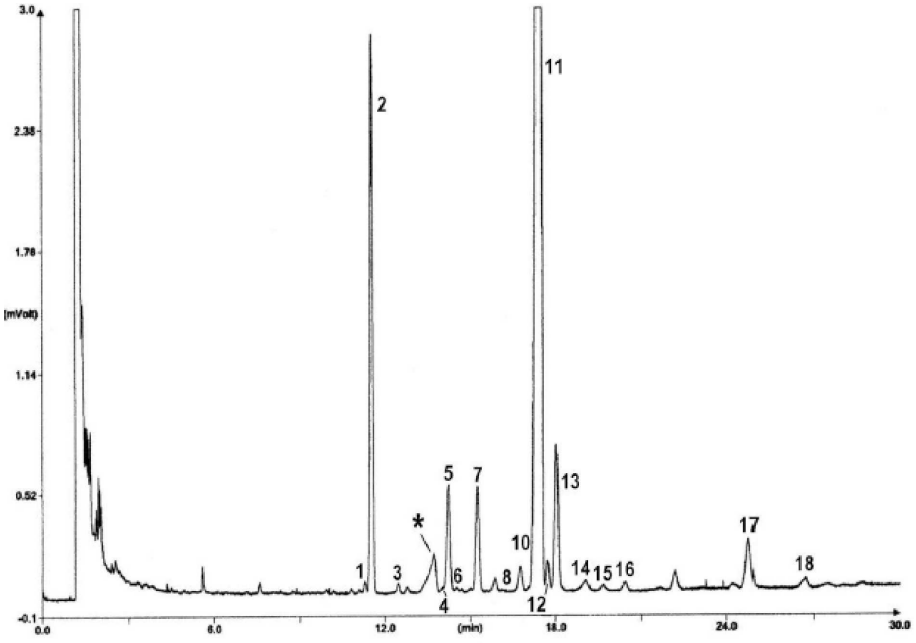
Πίνακας I — Σχετικοί χρόνοι κατακράτησης των στερολών

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

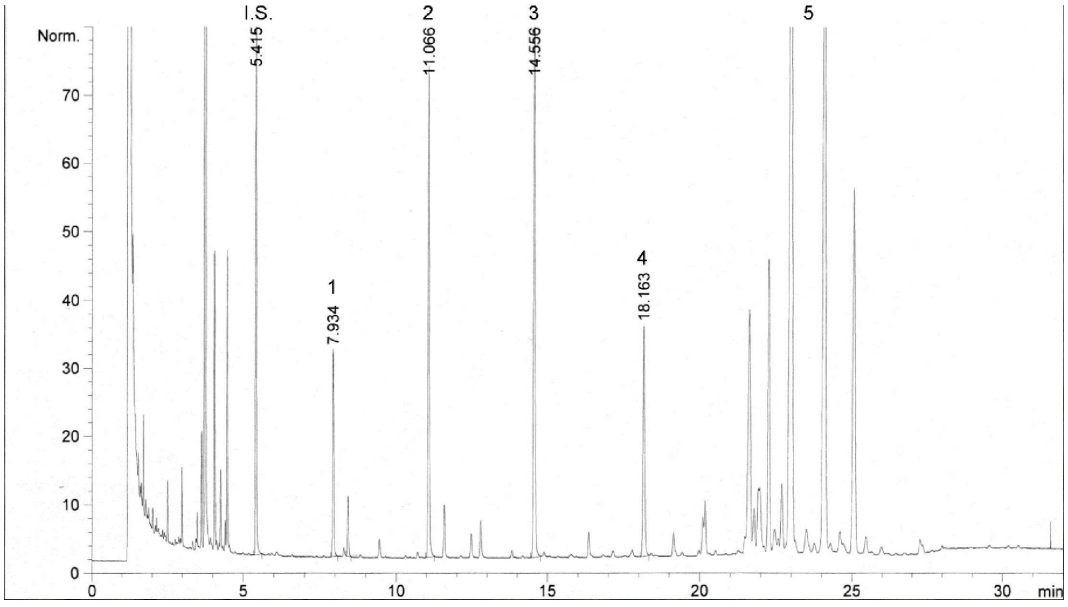
Κορυφή	Ταυτοποίηση		Σχετικός χρόνος κατακράτησης	
			Στήλη SE 54	Στήλη SE 52
11	β-σιτοστερόλη	(24R)-24-εθυλο-Δ-5-χοληστεν-3β-όλη	1,00	1,00
12	Σιτοστανόλη	24-αιθυλο-χολησταν-3β-όλη	1,02	1,02
13	Δ-5-αβεναστερόλη	(24Z)-24-αιθυλιδενο-Δ-χοληστεν-3β-όλη	1,03	1,03
14	Δ-5,24-στιγμασταδιενόλη	(24R,S)-24-αιθυλο-Δ-5,24-χολησταδιεν-3β-όλη	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



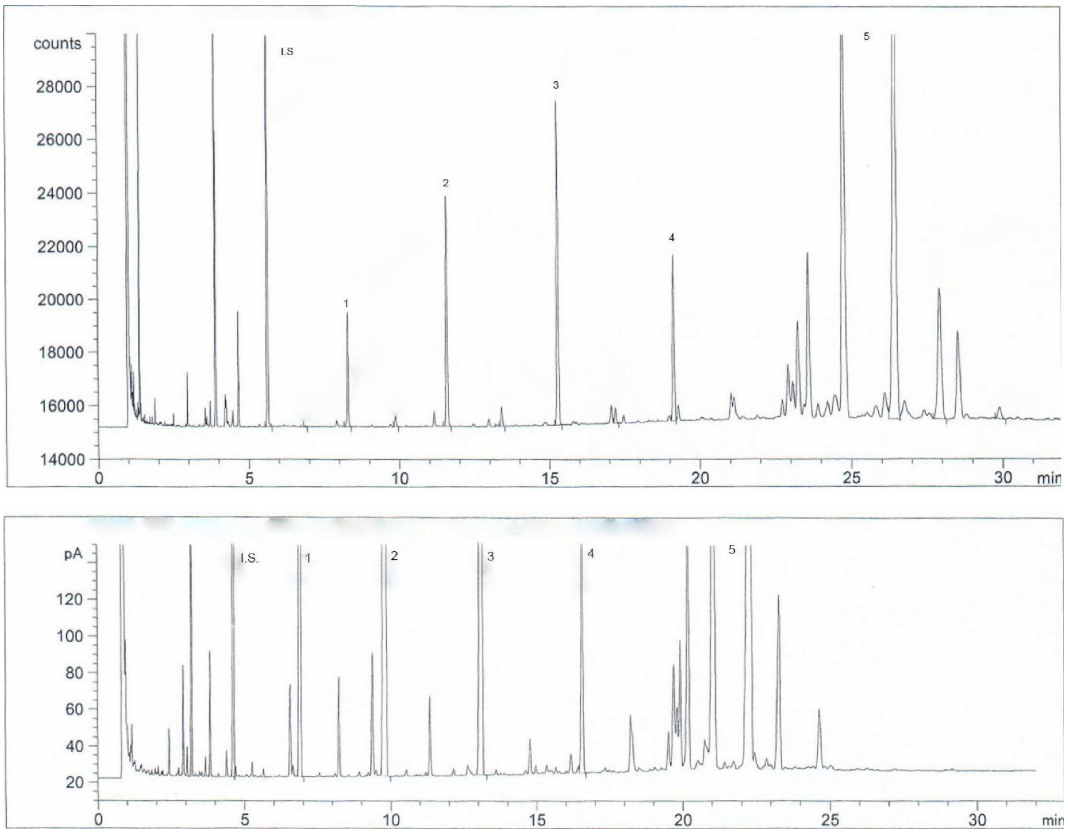
Σχήμα 2 — Χρωματογραφικό προφίλ GC-FID των στερολών και τριτερπενικών διαλκοολών από εξευγενισμένο ελαιόλαδο. (1) Χοληστερόλη, (2) α-χολεστανόλη (εσωτερικό πρότυπο), (3) 24-μεθυλενο-χοληστερόλη, (4) καμπεστερόλη, (5) καμπεστανόλη, (6) στιγμαστερόλη, (7) δ-5,23-στιγμασταδιενόλη, (8) κλεροστερόλη, (9) 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.



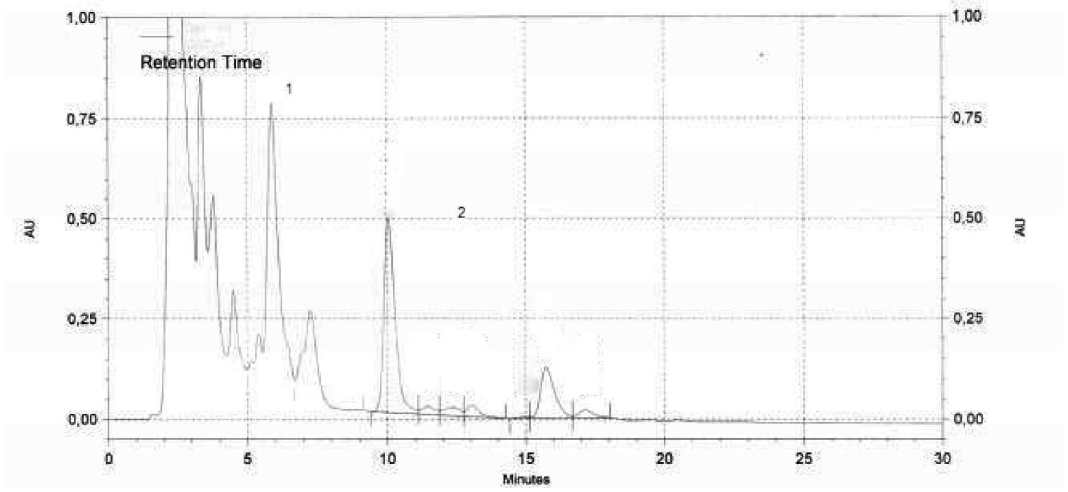
Σχήμα 3 — Χρωματογραφικό προφίλ GC-FID των στερολών και τριτερπενικών διαλκοολών από μειονεκτικό ελαιόλαδο (λαμπάντε). (1) Χοληστερόλη, (2) α-χολεστανόλη, (3) βρασικαστερόλη, (4) 24-μεθυλενο-χοληστερόλη, (5) καμπεστερόλη, (6) καμπεστανόλη, (7) στιγμαστερόλη, (8) δ-7-καμπεστερόλη, (9) δ-5,23-στιγμασταδιενόλη, (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.



Σχήμα 5 — Χρωματογραφικό προφίλ GC-FID των αλειφατικών αλκοολών και τριτερπενικών αλκοολών εξευγενισμένου ελαιόλαδου και ελαιόλαδου δεύτερης φυγοκέντρησης. (εσωτερικό πρότυπο) C20-όλη, (1) C22-όλη, (2) C24-όλη, (3) C26-όλη, (4) C28-όλη, (5) τριτερπενικές αλκοόλες.



Σχήμα 6 — Χρωματογράφημα HPLC ασαπωνοποίητων υλών ελαιόλαδου διαχωρισμένων με HPLC με τη χρήση ανιχνευτή υπεριώδους. (1) Αλειφατικές και τριτερπενικές αλκοόλες (2) Στερόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες»