

## ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 702/2007 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 21ης Ιουνίου 2007

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 ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 865/2004 του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, σχετικά με την κοινή οργάνωση της αγοράς ελαιολάδου και επιτραπέζιων ελίων και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 827/68 <sup>(1)</sup>, και ιδίως το άρθρο 5 παράγραφος 3,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 της Επιτροπής <sup>(2)</sup> ορίζει τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων, καθώς και τις μεθόδους προσδιορισμού των χαρακτηριστικών αυτών. Οι εν λόγω μέθοδοι, όπως και οι οριακές τιμές για τα χαρακτηριστικά των ελαιολάδων, πρέπει να επικαιροποιηθούν με συνεκτίμηση της γνωμοδότησης των ειδικών χημικών και σε συμφωνία με τις εργασίες που έχουν ολοκληρωθεί στο πλαίσιο του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου.
- (2) Οι ειδικοί χημικοί έκριναν, ιδίως, ότι ο ποσοτικός προσδιορισμός της εκατοστιαίας αναλογίας 2-μονοπαλμιτίνης παρέχει μεγαλύτερη ακρίβεια για την ανίχνευση των εστεροποιημένων ελαίων. Επίσης, η μείωση της οριακής τιμής για το σιγμασταδιένιο που περιέχεται στα παρθένα ελαιόλαδα βελτιώνει το διαχωρισμό των παρθένων ελαιολάδων από τα εξευγενισμένα κατά την παραγωγή.
- (3) Για να υπάρξει περίοδος προσαρμογής στα νέα πρότυπα και να καταστεί δυνατή η συγκρότηση των αναγκαίων μέσων για την εφαρμογή τους, καθώς και για να μην προκληθεί διαταραχή στις εμπορικές συναλλαγές, είναι σκόπιμο να εφαρμοστεί ο παρών κανονισμός από την 1η Ιανουαρίου 2008. Για τους ίδιους λόγους, πρέπει να προβλεφθεί ότι τα ελαιό-

λαδα και πυρηνέλαια που έχουν παρασκευασθεί και σημανθεί νομίμως στην Κοινότητα ή έχουν εισαχθεί νομίμως στην Κοινότητα και ετέθησαν σε ελεύθερη κυκλοφορία πριν από την ανωτέρω ημερομηνία, μπορούν να διατεθούν στην αγορά μέχρι να εξαντληθούν τα αποθέματα.

- (4) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής διαχείρισης ελαιολάδου και επιτραπέζιων ελίων,

ΕΞΕΛΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

## Άρθρο 1

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

- 1) Στο άρθρο 2 παράγραφος 1, η έκτη περίπτωση αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:
- «— για τον προσδιορισμό της εκατοστιαίας αναλογίας 2-μονοπαλμιτίνης, η μέθοδος που αναφέρεται στο παράρτημα VII.».
- 2) Τα παραρτήματα τροποποιούνται σύμφωνα με το παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

## Άρθρο 2

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

Εφαρμόζεται από την 1η Ιανουαρίου 2008.

Εντούτοις, τα προϊόντα που έχουν παρασκευασθεί και σημανθεί νομίμως στην Κοινότητα ή έχουν εισαχθεί νομίμως στην Κοινότητα και ετέθησαν σε ελεύθερη κυκλοφορία πριν από την 1η Ιανουαρίου 2008, μπορούν να διατεθούν στην αγορά μέχρι να εξαντληθούν τα αποθέματα.

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

Βρυξέλλες, 21 Ιουνίου 2007.

Για την Επιτροπή  
Mariann FISCHER BOEL  
Μέλος της Επιτροπής

<sup>(1)</sup> ΕΕ L 161 της 30.4.2004, σ. 97. Διορθώθηκε στην ΕΕ L 206 της 9.6.2004, σ. 37.

<sup>(2)</sup> ΕΕ L 248 της 5.9.1991, σ. 1. Κανονισμός όπως τροποποιήθηκε τελευταία με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1989/2003 (ΕΕ L 295 της 13.11.2003, σ. 57).

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Τα παραρτήματα του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 τροποποιούνται ως εξής:

1. Η σύνοψη τροποποιείται ως εξής:

α) ο τίτλος του παραρτήματος II αντικαθίσταται από τον ακόλουθο τίτλο:

«Προσδιορισμός των ελευθέρων λιπαρών οξέων, εν ψυχρώ μέθοδος»

β) ο τίτλος του παραρτήματος VII αντικαθίσταται από τον ακόλουθο:

«Προσδιορισμός της εκατοστιαίας αναλογίας 2-μονοπαλμιτίνης».

2. Το παράρτημα I αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

## «ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Κατηγορία	Οξύτητα (%) (*)	Αριθμός υπεροξειδίων mEq O <sub>2</sub> /kg (*)	Κηροί mg/kg (**)	2-μονοαλμυλίνη (%)	Στημ-σταδένιο mg/kg (1)	Διαφορά ECN42-HPLC και ECN42 (θεωρητικός υπολογισμός)	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>270</sub> (*)	Delta-K (*)	Οργανοληπτική εξέταση μείκτος του ελαιώματος (Md) (*)	Οργανοληπτική εξέταση μείκτος του φρουτώδους (Mf) (*)
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14 % ≤ 1,0 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Παρθένο ελαιόλαδο	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14 % ≤ 1,0 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Ελαιόλαδο λαμπάντε	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14 % ≤ 1,1 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (2)	—
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14 % ≤ 1,1 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Σύνθετο ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14 % ≤ 1,0 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Πυρηνέλαιο	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

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

(2) Ή εάν η διάμεσος του ελατώματος είναι μικρότερη ή ίση με 2,5 και η διάμεσος του φρουτώδους ίσοι με 0.

(3) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ελαιόλαδα λαμπάντε, εάν οι ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι χαμηλότερες ή ίσες με 350 mg/kg ή εάν η εκατοστιαία αναλογία ερυθροδίου 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 οι ολικές αλειφατικές αλκοόλες υπερβάνουν τα 350 mg/kg και εάν η εκατοστιαία αναλογία ερυθροδίου και ουβαόλης υπερβάνει το 3,5.

Κατηγορία	Περιεκτικότητα σε οξεία (1)						Αθροισμα των ισομερών του trans-λινολεϊκού + trans-ελαϊκού οξέος (%)	Αθροισμα των ισομερών του trans-λινολεϊκού + trans-ελαϊκού οξέος (%)	Σύνθεση των στερολών						Ολικές στερόλες (mg/kg)	Ερυθροδιόλη και ουβαδιόλη (%) (**)
	Μυριστικό (%)	Λινολενικό (%)	Αραχιδικό (%)	Εικοσενικό (%)	Βεχενικό (%)	Λιγνοκτρικό (%)			Χοληστερόλη (%)	Βροσκα-στερόλη (%)	Καμπε-στερόλη (%)	Στηνιστερόλη (%)	β-Σπιοστερόλη (%) (†)	δ-7-Στηνιστερόλη (%)		
1. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	
2. Παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	
3. Ελαιόλαδο λαμπάντε	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (‡)	
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	
5. Σύνθετο ελαιόλαδο αποτε- λούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,1	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	
6. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (4)	
7. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,2	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5	
8. Πυρηνέλαιο	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,2	≤ 4,0	< Καμπ.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	

(1) Περιεκτικότητα σε άλλα λιπαρά οξεία (%): παλμιτικό: 7,5-20,0· παλμιτελαϊκό: 0,3-3,5· δεκαεπταενικό: ≤ 0,3· δεκαεπταενικό: ≤ 0,3· στεατικό: 0,5-5,0· ελαϊκό: 55,0-83,0· λινολεϊκό: 3,5-21,0.

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

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

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

#### Σημειώσεις:

α) Τα αποτελέσματα των αναλύσεων πρέπει να εκφράζονται με τον αριθμό δεκαδικών ψηφίων που προβλέπεται για κάθε χαρακτηριστικό.

β) Το τελευταίο αριθμητικό ψηφίο πρέπει να αυξάνεται κατά μία μονάδα, εάν το επίμαχο ψηφίο είναι μεγαλύτερο από 4.

γ) Αρκεί και ένα μόνο χαρακτηριστικό να μην ανταποκρίνεται στις αναγραφόμενες τιμές για να αλλάξει το ελαιόλαδο κατηγορία ή να δηλωθεί ότι δεν είναι σύμφωνο όσον αφορά τη γνησιότητα.

δ) Τα χαρακτηριστικά που σημειώνονται με αστερίσκο (\*), αναφέρονται στην ποιότητα του ελαιολάδου, υποδηλώνουν ότι:

— προκειμένου για ελαιόλαδο λαμπάντε, τα σχετικά όρια μπορούν να μην τηρούνται συγχρόνως,

— προκειμένου για παρθένα ελαιόλαδα, η μη τήρηση τουλάχιστον ενός από τα όρια αυτά συνεπάγεται αλλαγή κατηγορίας, το ελαιόλαδο όμως εξαιρούμενο να κατατάσσεται σε μία από τις κατηγορίες παρθένου ελαιολάδου.

δ) Τα χαρακτηριστικά που σημειώνονται με δύο αστερίσκους (\*\*), αναφέρονται στην ποιότητα του ελαιολάδου, υποδηλώνουν ότι, για όλα τα πυρηνέλαια, τα σχετικά όρια μπορούν να μην τηρούνται συγχρόνως.\*

3. Το προσάρτημα 1 τροποποιείται ως εξής:

α) η πρώτη περίπτωση αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

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

β) η δέκατη τρίτη περίπτωση αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο::

«— Κορεσμένα λιπαρά οξέα στη Παράρτημα VII Προσδιορισμός της εκατοστιαίας αναλογίας 2-μονοπαλμιθίου».

4. Ο τίτλος του παραρτήματος II αντικαθίσταται από τον ακόλουθο τίτλο:

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ, ΕΝ ΨΥΧΡΩ ΜΕΘΟΔΟΣ»**

5. Το παράρτημα IV αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

#### «ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

#### **ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΚΗΡΟΥΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗΛΗΣ**

##### 1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

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

##### 2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

##### 3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

3.1. Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) των 25 ml.

3.2. Γυάλινη στήλη για αέρια χρωματογραφία, εσωτερικής διαμέτρου 15,0 mm και ύψους 30-40 cm, εφοδιασμένη με στρόφιγγα.

3.3. Αεριοχρωματογράφος δυνάμενος να λειτουργεί με τριχοειδή στήλη, εφοδιασμένος με σύστημα απευθείας εισαγωγής του δείγματος στη στήλη και αποτελούμενος από:

3.3.1. Θερμοστατούμενο θάλαμο στηλών, εξοπλισμένο με προγραμματιστή θερμοκρασίας.

3.3.2. Σύστημα έγχυσης εν ψυχρώ για απευθείας εισαγωγή στη στήλη.

3.3.3. Ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και μετατροπέα-ενισχυτή.

3.3.4. Καταγραφέα-ολοκληρωτή δυνάμενος να λειτουργεί με τον μετατροπέα-ενισχυτή (3.3.3), με χρόνο απόκρισης που δεν υπερβαίνει το 1 δευτερόλεπτο και με μεταβλητή ταχύτητα χαρτιού. (Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν πληροφορικά συστήματα, στα οποία τα αεριοχρωματογραφικά δεδομένα λαμβάνονται με τη βοήθεια υπολογιστή.)

3.3.5. Τριχοειδή στήλη από γυαλί ή τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, μήκους 8 έως 12 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, επικαλυμμένη εσωτερικά με υγρή φάση, ομοιόμορφου πάχους 0,10 έως 0,30 μm (Κατάλληλη υγρή φάση του εμπορίου, τύπου SE 52 ή SE 54.)

3.4. Μικροσύριγγα των 10 μl για την απευθείας εισαγωγή στη στήλη, με συγκολλημένη στο σώμα της βελόνα.

- 3.5. Ηλεκτρικός δονητής.
- 3.6. Περιστροφικός εξατμιστήρας.
- 3.7. Ηλεκτρικός κλίβανος.
- 3.8. Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια ζύγισης  $\pm 0,1$  mg.
- 3.9. Συνήθη εργαστηριακά γυάλινα σκεύη.

#### 4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 4.1. Διοξείδιο του πυριτίου (silica gel) κοκκομετρικού βαθμού 60 έως 200  $\mu\text{m}$

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

- 4.2. n-εξάνιο για χρωματογραφία.
- 4.3. Αιθυλαιθέρας για χρωματογραφία.
- 4.4. n-επτάνιο για χρωματογραφία.
- 4.5. Πρότυπο διάλυμα λαυρικού αραχιδεστέρα 0,1 % (m/V) σε εξάνιο (εσωτερικό πρότυπο) (Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί παλμτικός παλμιτεστέρας ή μυριστικός στεατεστέρας.)

##### 4.5.1. Χρωστική Sudan 1 (1-φαινυλ-αζω-2-ναφθόλη)

- 4.6. Φέρον αέριο: καθαρό υδρογόνο ή ήλιο, για αέρια χρωματογραφία
- 4.7. Βοηθητικά αέρια:

— καθαρό υδρογόνο για αέρια χρωματογραφία,

— καθαρός αέρας, για αέρια χρωματογραφία.

#### 5. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

##### 5.1. Ετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης

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

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

##### Σημειώσεις:

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

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

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

## 5.2. Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία

### 5.2.1. Προκαταρκτικές εργασίες

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

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

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

### 5.2.2. Επιλογή των συνθηκών εργασίας

Κατά κανόνα, πρέπει να τηρούνται οι ακόλουθες συνθήκες εργασίας:

— θερμοκρασία της στήλης:

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

— θερμοκρασία του ανιχνευτή: 350 °C,

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

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

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

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

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

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

## 5.3. Εκτέλεση της ανάλυσης

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

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

Η βασική γραμμή πρέπει πάντοτε να αναπαοκρίνεται στους απαιτούμενους όρους.

#### 5.4. Ταυτοποίηση των κορυφών

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

Το κατωτέρω σχήμα απεικονίζει χρωματογράφημα των κηρών παρθένου ελαιολάδου.

#### 5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός

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

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

$$\text{εστέρας, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1\,000}{A_s \times m}$$

όπου:

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

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

$m_s$  = η προστιθέμενη μάζα εσωτερικού προτύπου, σε χιλιοστόγραμμα,

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

#### 6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

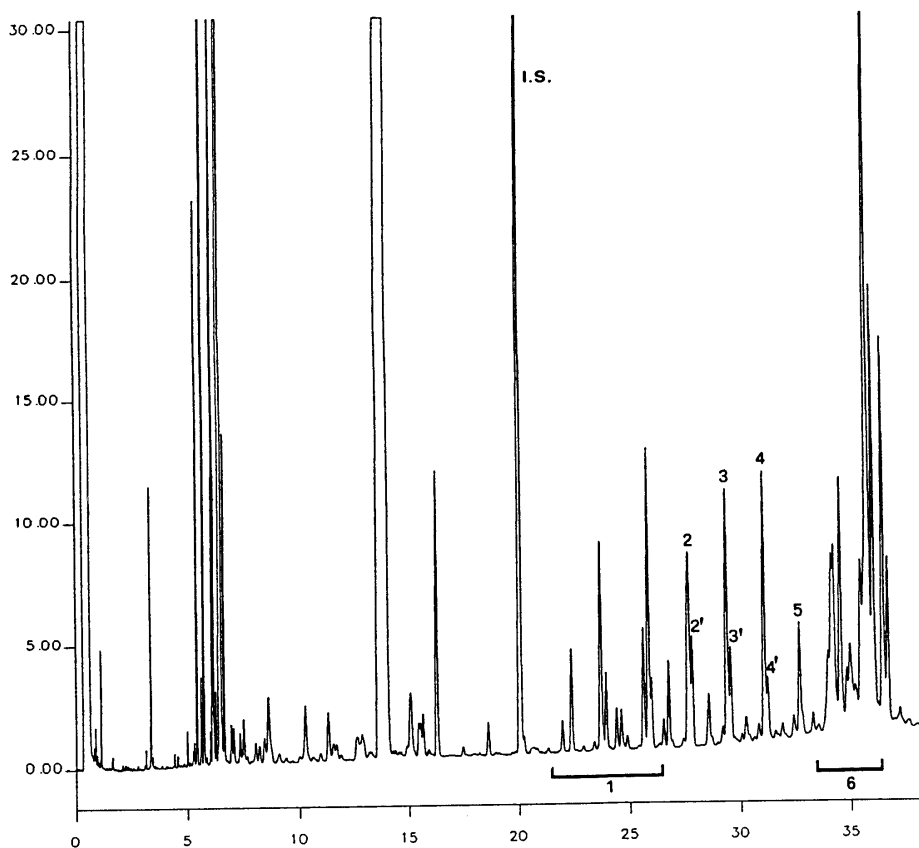
Αναφέρεται το άθροισμα των τιμών περιεκτικότητας σε κηρούς  $C_{40}$  έως  $C_{46}$ , σε mg/kg λιπαρής ουσίας (ppm).

*Σημείωση:* Τα συστατικά που πρέπει να προσδιορίζονται ποσοτικά αναφέρονται στις κορυφές που αντιστοιχούν σε εστέρες με άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα μεταξύ  $C_{40}$  και  $C_{46}$ , κατά το παράδειγμα του χρωματογραφήματος κηρών ελαιολάδου που εμφανίζεται στο κατωτέρω σχήμα. Σε περίπτωση διπλής εμφάνισης του εστέρα  $C_{46}$ , συνιστάται η ταυτοποίησή του με ανάλυση του κλάσματος των κηρών πυρηνελαίου, όπου η κορυφή  $C_{46}$  αναγνωρίζεται εύκολα, καθώς υπερισχύει σαφώς.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με ένα δεκαδικό ψηφίο.



Σχήμα  
Χρωματογράφημα κηρών παρθένου ελαιολάδου (\*)



Υπόμνημα:

I.S. = λαυρικός αραχιδεστέρας

1 = Διτερπενικοί εστέρες

2 + 2' = Εστέρες C<sub>40</sub>

3 + 3' = Εστέρες C<sub>42</sub>

4 + 4' = Εστέρες C<sub>44</sub>

5 = Εστέρες C<sub>46</sub>

6 = Τριτερπενικοί εστέρες στερολών και αλκοόλης.

(\*) Μετά την έκλυση των εστέρων των στερολών, το χρωματογράφημα δεν πρέπει να παρουσιάζει σημαντικές κορυφές (τριγλυκερίδια).

#### Προσάρτημα

##### Προσδιορισμός της γραμμικής ταχύτητας του αερίου

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

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

6. Το παράρτημα VII αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VII

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΚΑΤΟΣΤΙΑΙΑΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ 2-ΜΟΝΟΠΑΛΜΙΤΙΝΗΣ**

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

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

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

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

3. ΣΥΝΗΘΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- 3.1. Κωνική φιάλη (Erlenmeyer) των 25 ml
- 3.2. Ποτήρια ζέσεως των 100, 250 και 300 ml
- 3.3. Γυάλινη χρωματογραφική στήλη, εσωτερικής διαμέτρου 21-23 mm και μήκους 400 mm, εφοδιασμένη με πλάκα από συντετηγμένο γυαλί και στρόφιγγα
- 3.4. Ογκομετρικοί κύλινδροι των 10, 50, 100 και 200 ml
- 3.5. Σφαιρικές φιάλες των 100 και 250 ml
- 3.6. Περιστροφικός εξατμιστήρας
- 3.7. Σωλήνες φυγοκέντρου των 10 ml, με κωνικό πυθμένα και εσφυρισμένο πόμα
- 3.8. Φυγόκεντρος για σωλήνες των 10 και 100 ml
- 3.9. Θερμοστάτης ικανός να διατηρεί τη θερμοκρασία στους  $40 \pm 0,5$  °C
- 3.10. Βαθμολογημένα σφώνια του 1 και των 2 ml
- 3.11. Υποδερμική σύριγγα του 1 ml
- 3.12. Μικροσύριγγα των 100 μl
- 3.13. Διαχωριστική χοάνη των 1 000 ml
- 3.14. Αεριοχρωματογράφος για τριχοειδείς στήλες, εφοδιασμένος με σύστημα έγχυσης εν ψυχρώ "on column" για απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη και με κλίβανο ικανό να διατηρεί την επιλεγόμενη θερμοκρασία με ακρίβεια 1 °C
- 3.15. Σύστημα έγχυσης εν ψυχρώ "on column" για απευθείας εισαγωγή του δείγματος στη στήλη
- 3.16. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας και ηλεκτρόμετρο
- 3.17. Καταγραφέας-ολοκληρωτής κατάλληλος για το ηλεκτρόμετρο, με χρόνο απόκρισης που δεν υπερβαίνει το 1 δευτερόλεπτο και με μεταβλητή ταχύτητα χαρτιού
- 3.18. Τριχοειδής στήλη από γυαλί ή τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, μήκους 8 έως 12 μέτρων, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 έως 0,32 mm, επικαλυμμένη με μεθυλοπολυσιλοξάνιο ή φαινυλοπολυσιλοξάνιο 5 %, πάχους 0,10 έως 0,30 μm, με δυνατότητα χρήσης στους 370 °C
- 3.19. Μικροσύριγγα των 10 μl για την απευθείας εισαγωγή στη στήλη, μήκους τουλάχιστον 7,5 cm, με συγκολλημένη στο σώμα της βελόνα

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ
- 4.1. Διοξείδιο του πυριτίου (silica gel) κοκκομετρικού βαθμού μεταξύ 0,063 και 0,200 mm (70/280 mesh), που παρασκευάζεται ως εξής: τοποθετείται η silica gel σε κάψα από πορσελάνη, ξηραίνεται στο πυριατήριο στους 160 °C επί 4 ώρες και, κατόπιν, αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέσα σε ξηραντήρα. Προστίθεται ποσότητα νερού ίση με 5 % του βάρους του silica gel ως εξής: σε φιάλη Erlenmeyer των 500 ml ζυγίζονται 152 g silica gel και προστίθενται 8 g απεσταγμένου νερού. Η φιάλη πωματίζεται και το σύνολο ανακινείται ήπια, ώστε να επιτευχθεί ομοιογενής κατανομή του νερού, και αφήνεται σε ηρεμία τουλάχιστον επί 12 ώρες πριν χρησιμοποιηθεί.
- 4.2. n-εξάνιο (χρωματογραφικής καθαρότητας)
- 4.3. Ισοπροπανόλη
- 4.4. Υδατικό διάλυμα ισοπροπανόλης 1:1 (κ.ό.)
- 4.5. Παγκρεατική λιπάση. Η δραστηριότητα της χρησιμοποιούμενης λιπάσης πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 2,0 και 10 μονάδων λιπάσης ανά mg. (Στο εμπόριο κυκλοφορούν παγκρεατικές λιπάσες με δραστηριότητα 2,0 έως 10 μονάδων ανά mg ενζύμου.)
- 4.6. Ρυθμιστικό διάλυμα τρις-υδροξυ-μεθυλαμινομεθανίου: υδατικό διάλυμα 1 M, του οποίου το pH ρυθμίζεται στην τιμή 8 (ποτενσιομετρικός έλεγχος) με πυκνό HCl (1:1 κ.ό.)
- 4.7. Χολικό νάτριο ενζυματικής καθαρότητας, υδατικό διάλυμα 0,1 % (το διάλυμα αυτό πρέπει να χρησιμοποιείται εντός 15 ημερών από την παρασκευή του)
- 4.8. Χλωριούχο ασβέστιο, υδατικό διάλυμα 22 %
- 4.9. Διαιθυλαϊθέρας για χρωματογραφία
- 4.10. Διαλύτης ανάπτυξης: μείγμα η-εξανίου και διαιθυλαϊθέρα 87:13 (κ.ό.)
- 4.11. Υδροξείδιο του νατρίου, διάλυμα 12 % κ.β.
- 4.12. Φαινολοφθαλείνη, διάλυμα 1 % σε αιθανόλη
- 4.13. Φέρον αέριο: υδρογόνο ή ήλιο για αέρια χρωματογραφία
- 4.14. Βοηθητικά αέρια: – υδρογόνο, καθαρότητας τουλάχιστον 99 %, απαλλαγμένο υγρασίας και οργανικών ουσιών – και αέρας της ίδιας καθαρότητας, για αέρια χρωματογραφία
- 4.15. Αντιδραστήριο σιλυλίωσης: μείγμα πυριδίνης-εξαμεθυλοδισιλαζανίου-τριμεθυλοχλωροσιλανίου 9:3:1 (κ.ό.) (Στο εμπόριο κυκλοφορούν έτοιμα διαλύματα. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και άλλα αντιδραστήρια σιλυλίωσης, όπως π.χ. δις-τριμεθυλοσιλυλοτριφθορακεταμίδιο + 1 % τριμεθυλοχλωροσιλάνιο, αρωμαμένα με ίσο όγκο ανυδρης πυριδίνης.)
- 4.16. Ουσίες αναφοράς: καθαρά μονογλυκερίδια ή μείγματα μονογλυκεριδίων γνωστής εκατοστιαίας σύστασης, ανάλογης με τη σύσταση του δείγματος.
5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
- 5.1. Προετοιμασία του δείγματος
- 5.1.1. Τα έλαια με περιεκτικότητα σε ελεύθερα οξέα κάτω του 3 % δεν χρειάζεται να εξουδετερώνονται πριν από τη χρωματογραφία σε στήλη silica gel. Τα έλαια των οποίων η περιεκτικότητα σε ελεύθερα οξέα υπερβαίνει το 3 % πρέπει να εξουδετερώνονται σύμφωνα με το σημείο 5.1.1.1.
- 5.1.1.1. Στη διαχωριστική χοάνη των 1 000 ml (3.13) φέρονται 50 g ελαίου και 200 ml n-εξανίου. Προστίθενται 100 ml ισοπροπανόλης και ποσότητα διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 12 % (4.11) η οποία αντιστοιχεί στην περιεκτικότητα του ελαίου σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, προσαυξημένη κατά 5 %. Το σύνολο αναδεύεται ζωηρά επί ένα λεπτό, προστίθενται 100 ml απεσταγμένου νερού, αναδεύεται πάλι και αφήνεται σε ηρεμία.
- Μετά το διαχωρισμό, απορρίπτεται η κατώτερη στιβάδα που περιέχει τους σάπωνες και απομακρύνονται οι πιθανές ενδιάμεσες στιβάδες (βλέννες και αδιάλυτες ουσίες). Το εξανικό διάλυμα του εξουδετερωμένου ελαίου εκπλύνεται με διαδοχικές δόσεις 50-60 ml διαλύματος ισοπροπανόλης σε νερό 1:1 (κ.ό.) (4.4) μέχρι να εξαφανιστεί το ρόδινο χρώμα της φαινολοφθαλείνης.
- Απομακρύνεται το μεγαλύτερο μέρος του εξανίου με απόσταξη υπό κενό (χρησιμοποιείται π.χ. περιστροφικός εξατμιστήρας) και το έλαιο μεταγγίζεται σε σφαιρική φιάλη των 100 ml (3.5) και ξηραίνεται υπό κενό μέχρι να απομακρυνθεί τελείως ο διαλύτης.
- Μετά το τέλος της εργασίας αυτής, η οξύτητα του ελαίου πρέπει να είναι μικρότερη από 0,5 %.

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

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

- 5.1.3. *Ετοιμασία της χρωματογραφικής στήλης*

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

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

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

- 5.1.4. *Χρωματογραφία στήλης*

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

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

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

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

Ζυγίζεται η σφαιρική φιάλη και υπολογίζεται το εκχύλισμα που συλλέχθηκε.

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

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

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

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

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

- 5.2. **Υδρόλυση με παγκρεατική λιπάση**

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

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

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

- 5.3. **Παρασκευή των σιλολοπαραγώγων και προετοιμασία της αέριας χρωματογραφίας**

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

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

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

#### 5.4. Αέρια χρωματογραφία

Οι συνθήκες εργασίας είναι οι ακόλουθες:

- θερμοκρασία του συστήματος έγχυσης ("on column") μικρότερη από το σημείο ζέσεως του διαλύτη (68 °C),
- θερμοκρασία του ανιχνευτή: 350 °C,
- θερμοκρασία της στήλης: προγραμματισμός της θερμοκρασίας του κλιβάνου: 60 °C επί 1 λεπτό, αύξηση 15 °C ανά λεπτό μέχρι τους 180 °C και έπειτα 5 °C ανά λεπτό μέχρι τους 340 °C, κατόπιν 340 °C επί 13 λεπτά,
- φέρον αέριο: υδρογόνο ή ήλιο, ρυθμισμένο στην κατάλληλη γραμμική ταχύτητα, ώστε να επιτευχθεί η διαχωριστική ικανότητα που αποτυπώνεται στο σχήμα 1. Ο χρόνος κατακράτησης του τριγλυκεριδίου C<sub>54</sub> πρέπει να είναι 40 ± 5 λεπτά (βλέπε σχήμα 2). (Οι ανωτέρω συνθήκες εργασίας προτείνονται ενδεικτικά. Κάθε τεχνικός οφείλει να τις βελτιστοποιεί για να επιτύχει την επιθυμητή διαχωριστική ικανότητα. Η κορυφή που αντιστοιχεί στην 2-μονοπαλμιτίνη πρέπει να έχει ελάχιστο ύψος 10 % της κλίμακας του καταγραφέα.),
- εγχέομενη ποσότητα ουσίας: 0,5-1 μl του n-εξανικού διαλύματος (5 ml) (5.3.3).

##### 5.4.1. Ταυτοποίηση των κορυφών

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

##### 5.4.2. Ποσοτικός προσδιορισμός

Το εμβαδόν κάθε κορυφής υπολογίζεται με ηλεκτρονικό ολοκληρωτή.

#### 6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

όπου:

A<sub>x</sub> = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στη 2-μονοπαλμιτίνη,

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

Το αποτέλεσμα πρέπει να εκφράζεται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

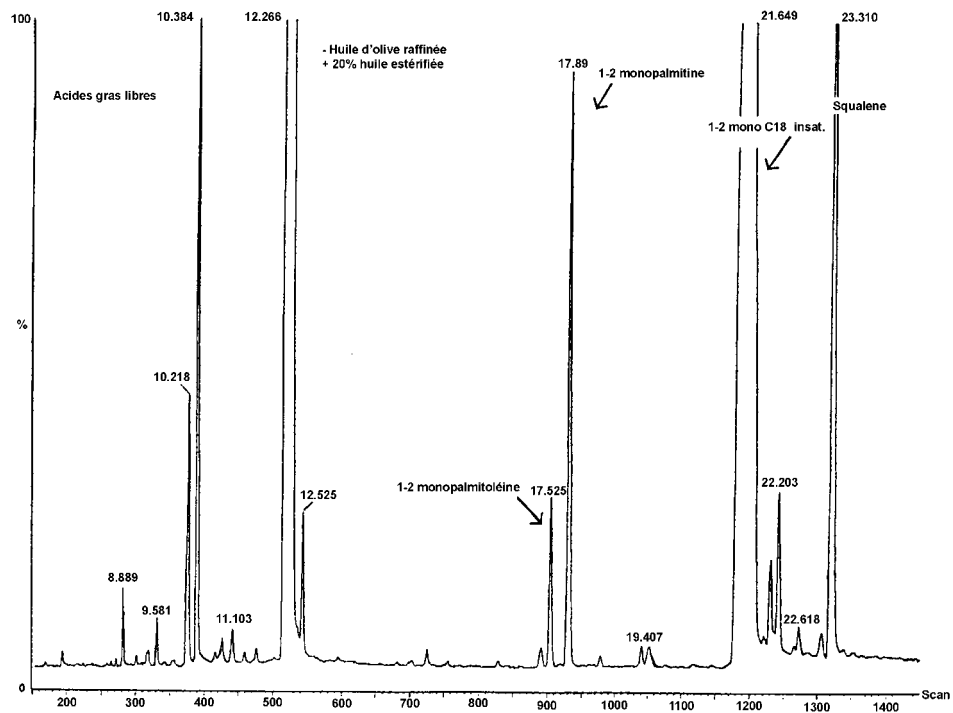
#### 7. ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Στην έκθεση της ανάλυσης θα πρέπει να αναφέρονται τα εξής:

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

Σχήμα 1

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



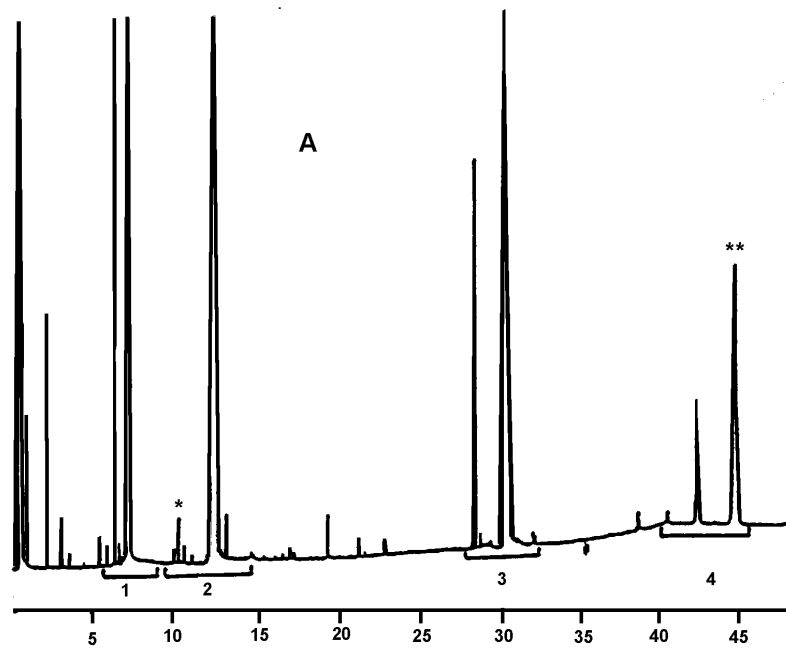
Key: "acides gras libres" = free fatty acids; "Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée" = refined olive oil + 20 % esterified oil; "1-2 monopalmitoléine" = 1-2 monopalmitolein; "1-2 mono C<sub>18</sub> insat." = unsaturated 1-2 mono C<sub>18</sub>

Σχήμα 2

## Χρωματογράφημα:

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

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



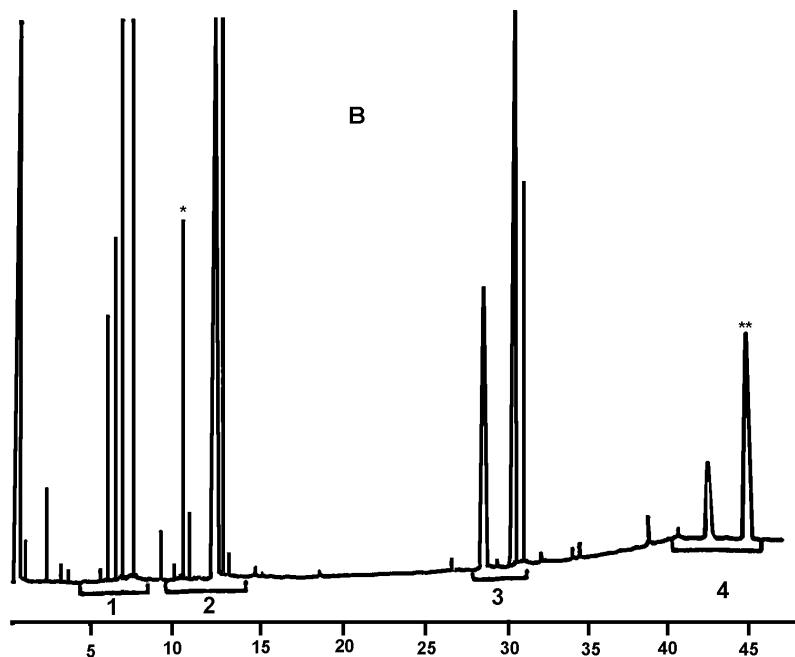
## Υπόμνημα:

- 1 = Ελεύθερα λιπαρά οξέα
- 2 = Μονογλυκερίδια
- 3 = Διγλυκερίδια
- 4 = Τριγλυκερίδια
- \* = 2-μονοπαλμτίνη
- \*\* = Τριγλυκερίδιο C<sub>54</sub>

**Χρωματογράφημα:**

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

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

**Υπόμνημα:**

- 1 = Ελεύθερα λιπαρά οξέα
- 2 = Μονογλυκερίδια
- 3 = Διγλυκερίδια
- 4 = Τριγλυκερίδια
- \* = 2-μονοπαλμτίνη
- \*\* = Τριγλυκερίδιο C<sub>54</sub>

**8. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ****Σημείωση 1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ**

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

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

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



**Σημείωση 2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ**

Παρασκευάζεται γαλάκτωμα ελαιολάδου ως εξής:

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

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

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

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

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

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

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

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

όπου:

A = η δραστηριότητα σε μονάδες λιπάσης/mg.

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

N = η κανονικότητα του διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου,

m = η μάζα της ελεγχόμενης λιπάσης, σε mg.

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

7. Στο παράρτημα X“Α”, το σημείο 6.2 αντικαθίσταται από το ακόλουθο κείμενο:

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