380L0891

27.9.80 *EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI* N:o L 254/35

KOMISSION DIREKTIIVI,

annettu 25 päivänä heinäkuuta 1980,

yhteisön analyysimenetelmästä elintarvikkeena sellaisenaan käytettävien tai elintarvikkeisiin lisättyjen öljyjen ja rasvojen sisältämän erukahappopitoisuuden määrittämiseksi

(80/891/ETY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon elintarvikkeena sellaisenaan käytettävissä öljyissä ja rasvoissa tai elintarvikkeissa, joihin on lisätty öljyä ja rasvoja, sisältämän erukahapon enimmäispitoisuudesta 20 päivänä heinäkuuta 1976 annetun neuvoston direktiivin 76/621/ETY([1]) ja erityisesti sen 3 artiklan,

sekä katsoo, että

direktiivin 76/621/ETY 2 artiklassa säädetään, että mainitun direktiivin 1 artiklassa tarkoitettu tuotteiden erukahappopitoisuus ei saa olla enemmän kuin viisi prosenttia laskettuna rasva-ainesosassa olevien rasvahappojen kokonaistasosta,

direktiivin 76/621/ETY 3 artiklassa säädetään, että erukahappopitoisuutta tarkastetaan yhteisön analyysimenetelmällä,

näytteenotosta, näytteiden luokittelusta ja öljykasvien siementen öljypitoisuudesta, epäpuhtauksista ja kosteuspitoisuudesta annetun asetuksen (ETY) N:o 1470/68([2]) liitteessä VI, sellaisena kuin se on asetuksessa (ETY) N:o 72/77([3]), säädetään analyysimenetelmästä, jolla määritetään rapsin ja rypsin siementen erukahappopitoisuus; tätä menetelmää tulisi käyttää seulontamenetelmänä,

öljyjen ja rasvojen sisältämiä rasvahappoja analysoitaessa kaasu-nestekromatografisesti normaaleissa olosuhteissa ei ole mahdollista erottaa erukahappoa muista dokoseenihapon isomeereista kuten setoleenihaposta,

on tarpeen määrittää erukahapon taso öljyissä ja rasvoissa, kuten myös elintarvikkeissa, joihin on lisätty öljyjä ja rasvoja, jotka voivat sisältää setoleenihappoa ja muita dokoseenihapon isomeereja,

erukahapon määrää ei kuitenkaan tarvitse määrittää öljyistä ja rasvoista eikä elintarvikkeista, joihin on lisätty öljyjä ja rasvoja, jos seulontamenetelmillä on todettu, ettei erukahapon määrä ylitä viittä prosenttia dokoseenihappojen tai cis-dokoseenihappojen määrästä,

kunnes parempi erukahapon määrityksessä käytettävä analyysimenetelmä otetaan käyttöön, katsotaan tämä analyysimenetelmä tällä hetkellä parhaiten soveltuvaksi, ja

tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän elintarvikekomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Jäsenvaltioiden on säädettävä, että direktiivin 76/621/ETY 1 artiklassa tarkoitettujen tuotteiden erukahappopitoisuuden määrittämiseksi tarvittavat analyysit suoritetaan 2 artiklan mukaisesti.

2 artikla

1. Seulontaa varten on määritettävä:

a) dokoseenihappojen kokonaismäärä 1 artiklassa tarkoitetuista tuotteista menetelmällä, joka on selostettu asetuksen (ETY) N:o 1470/68 liitteessä VI; tai

b) cis-dokoseenihappojen kokonaismäärä 1 artiklassa tarkoitetuista tuotteista menetelmällä, joka on selostettu asetuksen (ETY) N:o 1470/68 liitteessä VI ja jossa käytetään kaasu-nestekromatografiaa olosuhteissa, joissa cis- ja transisomeerit erottuvat; liikkumattomista faaseista tähän tarkoitukseen sopivat esimerkiksi syaanipropyylipolysiloksaanit tai nestekiteet.

2. Jos:

a) dokoseenihappojen, määritettynä 1 kohdan a alakohdan mukaisesti, tai

b) cis-dokoseenihappojen, määritettynä 1 kohdan b alakohdan mukaisesti,

([1]) EYVL N:o L 202, 28.7.1976, s. 35
([2]) EYVL N:o L 239, 28.9.1968, s. 2
([3]) EYVL N:o L 12, 15.1.1977, s. 11

kokonaismäärä ei 1 artiklassa tarkoitetuista tuotteista, lasketuna niiden rasva-ainesosien kokonaisrasvahappokoostumuksen perusteella, ole enempää kuin viisi prosenttia, ei muita määrityksiä tarvita. Muussa tapauksessa erukahappopitoisuus määritetään liitteessä selostetun menetelmän avulla.

3 artikla

Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset tai hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 1 päivänä helmikuuta 1982. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

4 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 25 päivänä heinäkuuta 1980.

Komission puolesta
Étienne DAVIGNON
Komission jäsen

LIITE

ERUKAHAPPOPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN ELINTARVIKKEENA KÄYTETTÄVISTÄ ÖLJYISTÄ JA RASVOISTA SEKÄ ELINTARVIKKEISTA, JOIHIN ON LISÄTTY ÖLJYJÄ TAI RASVOJA

I. JOHDANTO

1. NÄYTTEEN VALMISTAMINEN

1.1 **Yleistä**

Analysoitavan laboratorionäytteen painon on oltava tavallisesti 50 grammaa, jollei tarvita suurempia määriä.

1.2 **Näytteen valmistaminen**

Näyte pitää homogenisoida ennen analyysiä.

1.3 **Säilytysastiat**

Edellä mainitulla tavalla valmistettu näyte pitää aina säilyttää ilma- ja vesitiiviissä säilytysastiassa.

2. REAGENSSIT

2.1 **Vesi**

2.1.1 Jos vettä tarvitaan liuottimeksi, laimentamiseen tai pesemiseen, on käytettävä tislattua tai vähintään yhtä puhdasta mineraalitonta vettä.

2.1.2 Jos mainitaan "liuos" tai "laimennos" ilman erillistä muun reagenssin määrittelyä, tarkoitetaan vesiliuosta tai -laimennosta.

2.2 **Kemikaalit**

Kaikkien käytettävien kemikaalien pitää olla hyväksyttävää analyysilaatua, jollei toisin ilmoiteta.

3. LAITTEET

3.1 **Laiteluettelo**

Tässä luettelossa on ainoastaan ne välineet, jotka ovat erityiskäyttöön tarkoitettuja tai tarkoin määriteltyjä.

3.2 **Analyysivaaka**

"Analyysivaa'alla" tarkoitetaan vaakaa, jonka herkkyys on 0.1 mg tai parempi.

4. TULOSTEN ESITTÄMINEN

4.1 **Tulokset**

Virallisessa tutkimusselosteessa ilmoitettujen tulosten pitää olla keskiarvoja, jotka perustuvat vähintään kahteen määritykseen, joiden toistettavuus on hyväksyttävä.

4.2 **Prosenttiosuuden laskeminen**

Jollei toisin ilmoiteta, tulokset ilmoitetaan painoprosentteina rasvahappojen kokonaismäärästä laboratorion saamasta näytteestä.

4.3 **Merkitsevien lukujen määrä**

Merkitsevien lukujen määrä tuloksessa määräytyy menetelmän tarkkuuden perusteella.

II. ERUKAHAPON MÄÄRITTÄMINEN

1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA

Tällä menetelmällä määritetään erukahappopitoisuus:

i) öljyissä ja rasvoissa, jotka sisältävät setoleenihappoa (erityinen dokoseenihapon cis-isomeeri, jota esiintyy kalaöljyissä); ja

ii) hydratuissa öljyissä ja rasvoissa, jotka sisältävät dokoseenihapon trans- ja cis-isomeereja.

2. MÄÄRITELMÄ

Erukahappopitoisuus: erukahapon määrä määritettynä esitetyllä menetelmällä.

3. PERIAATE

Öljyn ja rasvan sisältämien rasvahappojen metyyliesterit erotetaan käyttämällä alhaisen lämpötilan hopeaohutkerroskromatografiaa ja määritetään kvantitatiivisesti kaasu-nestekromatografisesti.

4. REAGENSSIT

4.1 Peroksidivapaa juuri tislattu dietyylieetteri.

4.2 n-Heksaani.

4.3 Silikageeli G, ohutkerroskromatografiaan.

4.4 Silikageeli, pylväskromatografiaan.

4.5 Hopeanitraattiliuos, 200 g/l. Liuotetaan 24 g hopeanitraattia veteen, ja lisätään vettä 120 ml:aan saakka.

4.6 Metyylierukaattiliuos, 5 mg/ml. Liuotetaan 50 mg metyylierukaattia muutamaan ml:aan n-Heksaania ja laimennetaan n-Heksaanilla 10 ml:ksi.

4.7 Metyylitetrakosanoaatti, sisäinen standardiliuos, 0,25 mg/ml. Liuotetaan 25 mg metyylitetrakosanoaattia muutamaan ml:aan n-Heksaania (kuten 4.6. kohdassa) ja laimennetaan 100 ml:ksi n-Heksaanilla.

4.8 Kehitysliuos: Tolueeni ja n-Heksaani 90 : 10 (v/v).

4.9 2,7-dikloorifluoreskiiniliuos 0,5 g/l. Liuotetaan lämmittämällä ja sekoittamalla 50 mg 2,7-dikloori-fluoreskiinia 100 ml:aan 50-prosenttista metanolin vesiliuosta.

5. LAITTEET

5.1 Ohutkerroskromatografialaitteisto, johon sisältyy erityisesti:

5.1.1 Pakastusyksikkö, jossa voidaan säilyttää kehitysastiaa ja sen sisältöä – 20...– 25 C:n lämpötilassa.

5.1.2 Lasilevyt, 200 × 200 mm.

5.1.3 Ultraviolettilamppu.

5.1.4 Lasipylväät, pituudeltaan noin 200 mm ja sisähalkaisijaltaan noin 10 mm, joissa on pohjalla lasivillaa tai lasisintteri. Vaihtoehtoisesti pienet suppilot, joissa on lasisintterisuodattimet.

5.1.5 Applikaattori, jolla laitetaan liuokset kapeaksi nauhaksi tai juovaksi ohutkerroslevyille.

5.2 Kaasu-nestekromatografi, jossa on elektroninen integraattori, josta on kuvaus asetuksen (ETY) N:o 72/77 liitteessä VI olevassa III jaksossa.

6. MENETTELY

6.1 **Rasvahappojen metyyliesterien valmistaminen**

Otetaan noin 400 mg:n näyte öljy- tai rasvaosasta analysoitavaksi, ja valmistetaan liuos, joka sisältää 20–50 mg/ml rasvahapon metyyliestereitä n-heksaanissa menetelmällä, joka on kuvattu asetuksen (ETY) N:o 72/77 liitteessä VI olevassa II.3 jaksossa.

6.2 **Ohutkerroskromatografia**

6.2.1 *Levyjen valmistaminen*

Laitetaan 60 g silikageeliä (4.3) 500 ml:n pyöreäpohjaiseen kolviin, lisätään 120 ml hopeanitraattiliuosta (4.5) ja ravistetaan minuutin ajan, jotta saataisiin homogeeninen liete. Levitetään liete tavalliseen tapaan levyjen päälle; kerroksen paksuuden pitäisi olla noin 0.5 mm. Tämä määrä lietettä riittää viiden 200 × 200 mm:n levyn valmistamiseen.

Levyjen annetaan kuivua ilmassa osittain (jättämällä ne mielellään pimeään 30 minuutin ajaksi), ja kuivataan ne sitten täysin, ja aktivoidaan ne laittamalla uuniin 100 °C:n tasaiseen lämpötilaan 2,5 tunnin ajaksi. Levyt on käytettävä mahdollisimman nopeasti aktivoinnin jälkeen, tai ne on varastoitava huolellisesti pimeässä huoneessa ja aktivoitava uudelleen ennen käyttöä. (Huomautus: 1 tunnin aktivointi 110 °C:n lämpötilassa voi olla riittävä, jos levyt eivät ole tummentuneet käsiteltäessä). Merkitään viivat päällysteeseen 10 mm:n päähän reunoista ja sivuista jokaiseen levyyn ennen käyttöä vähentämään reunavaikutuksia kehityksen aikana.

6.2.2 *Metyyliestereiden asettaminen*

Applikaattoria (5.1.5) käyttäen laitetaan 50 l näytteestä valmistettua metyyliestereiden liuosta (6.1) kapeaksi noin 50 mm:n pituiseksi nauhaksi, vähintään 40 mm:n etäisyydelle levyn reunoista ja 10 mm:n päähän alareunasta. Samalla tavoin lisätään 100 l liuosta, jossa on tilavuudeltaan yhtä paljon valmistettua metyyliestereiden liuosta (6.1) ja metyylierukaattiliuosta (4.6). Liuosten lisäämisen yhteydessä on erityisesti varottava päällysteen helppoa särkyvyyttä. Metyyliesterien asettamisen jälkeen levy asetetaan seisomaan alareuna alaspäin dietyylietteriin, kunnes eetteri on noussut noin 5 mm näytteen asettamisalueen yläpuolelle. Tämä konsentroi metyyliesterit ohueksi vyöhykkeeksi. Huomautus: haluttaessa voidaan laittaa 50 l metyylierukaattiliuosta levylle auttamaan metyylierukaattivyöhykkeen tunnistamisessa kehityksen jälkeen (ks. kuva).

6.2.3 *Levyjen kehittäminen*

Kehitysliuos (4.8) kaadetaan säiliöön noin 5 mm:n kerrokseksi, ja säiliö asetetaan kannella suljettuna pakastesäiliöön (5.1.1), jonka lämpötila on – 25 °C tai mahdollisimman lähellä tätä lämpötilaa. (Joissain tapauksissa on hyödyllistä vuorata säiliö). Kahden tunnin kuluttua levy asetetaan huolellisesti säiliöön, ja annetaan liuottimen nousta puoleen väliin tai kahden kolmasosan korkeudelle levyä. Levy otetaan pois, ja haihdutetaan varovasti liuotin levystä typpivirralla. Levy laitetaan uudelleen säiliöön, ja annetaan liuottimen nousta levyn yläosaan. Levy otetaan pois kuten aikaisemmin, kuivataan typpivirralla ja ruiskutetaan sen jälkeen huolellisesti 2,7-dikloorifluoreskiiniliuoksella (4.9).

Kun levyä tarkastellaan ultraviolettivalossa, voidaan paikallistaa näytteestä peräisin oleva metyylierukaattia sisältävä vyöhyke referenssinäytteeseen lisätyn voimistetun metyylierukaattivyöhykkeen avulla (ks. kuva).

6.2.4 *Metyyliesterifraktioiden erottaminen*

Raaputetaan näytteestä peräisin oleva metyylierukaattivyöhyke 50 ml:n dekantterilasiin huolellisesti välttäen hävikkiä. Vastaavasti metyylierukaattivyöhykkeen ylä- ja alapuolella oleva silikageeli siirretään toiseen 50 ml:n dekantterilasiin. Tämä vyöhyke sisältää kaikki muut rasvahappojen metyyliesterifraktiot. Lisätään 1,0 ml metyylitetrakosanoaattistandardiliuosta (4.7) ja 10 ml dietyylieetteriä (4.1) jokaiseen dekantterilasiin. Hämmennetään ja siirretään dekantterilasien sisältö eri pylväisiin tai suppiloihin (5.1.4), joissa jokaisessa on noin 1 g silikageeliä; metyyliesterit eluoidaan käyttämällä kolme tai neljä 10 ml:n annosta dietyylieetteriä. Suodokset kerätään pieniin pulloihin. Haihdutetaan jokainen suodos tilavuudeltaan pienemmäksi käyttämällä heikkoa typpivirtaa, ja siirretään metyyliesterit pieniin suippopohjaisiin lasiputkiin. Loput liuottimesta poistetaan haihduttamalla typpivirrassa siten, että metyyliesterit konsentroituvat putkien pohjaan. Liuotetaan metyyliesterit noin 25–50 l:aan n-heksaania (4.2).

6.3 **Kaasu-nestekromatografia**

6.3.1 Noudatetaan asetuksen 72/77/ETY liitteessä VI olevassa III jaksossa esitettyä menettelyä, ja analysoidaan 1–2 l metyyliesteriliuosta, joka on saatu i) fraktiosta, joka sisältää metyylierukaatin, ja ii) fraktiot, jotka sisältävät jäljelle jääneet metyloidut rasvahapot.

6.3.2 Tulostetaan elektroniselta integraattorilta seuraavien piikkien pinta-alat:

i) metyylierukaatin sisältävän fraktion kromatogrammista:
   a) metyylierukaatti [E]
   b) sisäinen standardi [L_1]
   c) metyyliesteripiikkien kokonaisalat vähennettynä sisäisen standardin [EF] alalla;

ii) sen fraktion kromatogrammista, joka sisältää jäljelle jääneet rasvahappojen metyyliesterit
   a) metyyliesterien piikkien kokonaisala vähennettynä sisäisen standardin alalla [RF].
   b) sisäinen standardi [L_2].

7. TULOSTEN ESITTÄMINEN

7.1 Laskentamenetelmä ja -kaava

7.1.1 Näytteen erukahappopitoisuus, ilmaistuna metyyliesterinä prosentteina näytteen kokonaisrasvahappojen metyyliestereistä saadaan seuraavasti:

$$\frac{E}{L_1\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times 100$$

jossa

E, EF, RF, L_1 ja L_2 ovat 6.3.2. kohdassa tarkoitetut piikkien pinta-alat, korjattuna, jos on tarpeen, kalibrointikertoimilla.

Edellä olevan kaavan avulla saatu metyylierukaatin lukuarvo on sama kuin erukahappotaso ilmoitettuna prosentteina näytteen rasvahappojen kokonaistasosta.

7.1.2 Jos piikkipinta-alat tulostetaan prosenttiosuuksina, voidaan EF ja RF arvot laskea seuraavasti:

$EF = 100 - L_1$

$RF = 100 - L_2$

7.1.3 Edellä esitetty laskentamenetelmä (7.1.1) edellyttää, että näytteen tetrakosaanihapon määrä on mitätön. Jos tätä happoa näyttää olevan merkittäviä määriä, täytyy jäljelle jäävien rasvahappojen metyyliestereitä sisältävän fraktion kromatogrammista saatu tetrakosaanihapon määrä (L_2) vähentää:

$L_2 - T_2$

jossa

$$T_2 = \frac{T_0 P_2}{P_0}$$

ja

T_2 = näytteestä peräisin olevan metyylitetrakosanoaatin piikkipinta-ala, joka muodostaa osan piikkipinta-alasta, joka on peräisin sisäisestä standardista jäljelle jääneen rasvahappojen metyyliestereiden fraktion kromatogrammista.

P_2 = metyylipalmitaatin piikkipinta-ala, joka on saatu jäljelle jääneen fraktion kromatogrammista.

T_0 = metyylitetrakosanoaatin piikkipinta-ala, joka on saatu kokonaisrasvahappojen metyyliestereiden kromatogrammista määritettynä tämän direktiivin 2 artiklan mukaisesti.

P_0 = metyylipalmitaatin piikkipinta-ala, joka on saatu kokonaisrasvahappojen metyyliestereiden kromatogrammista määritettynä tämän direktiivin 2 artiklan mukaisesti.

7.1.4 *Kaavan johtaminen*

Rasvahappojen osuus fraktiossa, joka sisältää metyylierukaatin, ilmaistuna prosenttiosuutena rasvahappojen kokonaismäärästä saadaan seuraavasta kaavasta:

$$\frac{\frac{EF}{L_1}}{\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}} \times 100 \quad \text{tai} \quad \frac{EF}{L_1\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times 100$$

Erukahapon osuus metyylierukaattia sisältävässä fraktiossa saadaan seuraavasti:

$$\frac{E}{EF}$$

Siten erukahappopitoisuus näytteessä, prosentteina kokonaisrasvahapoista, saadaan seuraavasta kaavasta:

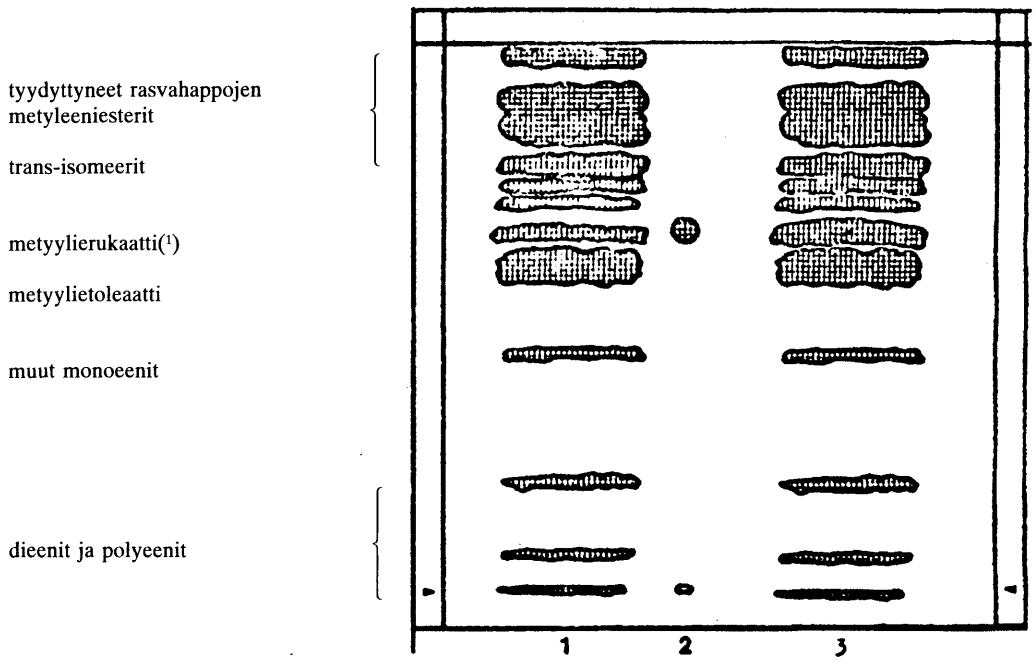
$$\frac{EF}{L_1\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times \frac{E}{EF} \times 100 \quad \text{tai} \quad \frac{E}{L_2\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times 100$$

7.1.5 *Toistettavuus*

Kahden tuloksen välinen ero ei saa olla suurempi kuin 10 % tuloksesta tai 0,5 grammaa näytteen 100 grammaa kohti laskettuna suuremman arvon mukaisesti, kun määritykset on suorittanut sama analysoija samanaikaisesti tai peräkkäin samoissa olosuhteissa.

KUVA

Tyypillinen ohutkerroskromatogrammi, jossa näkyy erukahapon, setoleenihapon sekä dokoseenihapon transisomeerien metyyliesterien erottuminen



1 näyte
2 metyylierukaatti;
3 näyte + metyylierukaatti

(1) Metyylierukaatiksi määritelty fraktio sisältää usein muiden monoeenihappojen metyyliestereitä, mutta siinä ei pitäisi olla metyylisetoleaattia.