DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 25 luglio 1980

relativa al metodo di analisi comunitario per la determinazione del tenore dell'acido erucico presente negli oli e nei grassi destinati tali e quali al consumo umano, nonché negli alimenti con aggiunta di oli o grassi

(80/891/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva 76/621/CEE del Consiglio, del 20 luglio 1976, relativa alla fissazione del tenore massimo in acido erucico negli oli e nei grassi destinati tali e quali al consumo umano, nonché negli alimenti con aggiunta di oli o grassi [1], in particolare l'articolo 3,

considerando che l'articolo 2 della direttiva 76/621/CEE stabilisce che, a decorrere dal 1° luglio 1979, il tenore in acido erucico dei prodotti di cui all'articolo 1 della suddetta direttiva, calcolato sul loro tenore globale in acidi grassi contenuti nella componente grassa, non potrà superare il 5 % ;

considerando che l'articolo 3 della direttiva 76/621/CEE stabilisce che il tenore in acido erucico dev'essere controllato con un metodo di analisi comunitario ;

considerando che il regolamento (CEE) n. 1470/68 della Commissione, del 23 settembre 1968, relativo al prelievo e alla riduzione dei campioni nonché alla determinazione del tenore in olio, in impurezze e in umidità dei semi oleaginosi [2], stabilisce nell'allegato VI, introdotto dal regolamento (CEE) n. 72/77 [3], un metodo di analisi per la determinazione del tenore in acido erucico nei semi di colza e di ravizzone ; che conviene utilizzare questo metodo come metodo di preselezione ;

considerando che in normali condizioni di analisi degli oli e dei grassi mediante la cromatografia gas-liquido degli acidi grassi costitutivi non è possibile distinguere l'acido erucico dagli altri isomeri dell'acido docosenoico, ad esempio, dall'acido cetoleico ;

considerando che è necessario determinare il tenore dell'acido erucico presente in oli e grassi, nonché in prodotti alimentari contenenti oli o grassi che possono, a loro volta, contenere acido cetoleico e isomeri dell'acido docosenoico ;

considerando che non è necessario determinare il tenore dell'acido erucico presente in oli, grassi e prodotti alimentari contenenti oli o grassi che, ad un'analisi preliminare, risultano contenere al massimo il 5 % del totale di acidi docosenoici o il 5 % di acidi cis-docosenoici ;

considerando inoltre che, nell'attesa della messa a punto di un metodo di analisi di determinazione dell'acido erucico più esatto, tale metodo d'analisi è da considerarsi per il momento come il più appropriato ;

considerando che le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente per i prodotti alimentari,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA :

Articolo 1

Gli Stati membri dispongono affinché le analisi necessarie alla determinazione del tenore in acido erucico dei prodotti di cui all'articolo 1 della direttiva 76/621/CEE siano effettuati conformemente all'articolo 2.

Articolo 2

1. Viene determinato, a titolo di preselezione :

a) il tenore dei prodotti di cui all'articolo 1 in acidi grassi docosenoici mediante il metodo descritto all'allegato VI del regolamento (CEE) n. 1470/68 ; oppure

b) il tenore totale dei prodotti di cui all'articolo 1 in acidi grassi cis-docosenoici, mediante il metodo descritto all'allegato VI del regolamento (CEE) n. 1470/68, utilizzando la cromatografia gas-liquido in condizioni tali che gli isomeri cis e trans degli acidi docosenoici siano separati ; le fasi stazionarie adeguate utilizzate per quest'analisi sono del tipo « cianopropilpolisilossano » o dei cristalli liquidi.

2. Se il tenore totale :

a) in acidi grassi docosenoici, determinato conformemente al paragrafo 1, lettera a), oppure

b) in acidi grassi cis-docosenoici determinato conformemente al paragrafo 1, lettera b)

---

(1) GU n. L 202 del 28. 7. 1976, pag. 35.
(2) GU n. L 239 del 28. 9. 1968, pag. 2.
(3) GU n. L 12 del 15. 1. 1977, pag. 11.

dei prodotti di cui all'articolo 1, calcolato nel loro tenore totale in acidi grassi nella fase grassa, supera il 5 %, il tenore in acido erucico viene determinato mediante il metodo descritto nell'allegato della presente direttiva.

Articolo 3

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva entro e non oltre il 1° febbraio 1982. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Articolo 4

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 25 luglio 1980.

Per la Commissione

Étienne DAVIGNON

Membro della Commissione

ALLEGATO

DETERMINAZIONE DEL TENORE DI ACIDO ERUCICO PRESENTE NEGLI OLI E NEI GRASSI DESTINATI TALI E QUALI AL CONSUMO UMANO, NONCHÉ NEGLI ALIMENTI CON AGGIUNTA DI OLI O GRASSI

I. INTRODUZIONE

1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1.1. Disposizioni generali

La massa del campione di laboratorio destinato all'analisi deve essere, di norma, pari a 50 g, a meno che sia necessario un quantitativo maggiore.

1.2. Preparazione del campione

Il campione deve essere omogeneizzato prima dell'analisi.

1.3. Conservazione

Il campione così preparato deve essere sempre conservato in un recipiente ermetico.

2. REATTIVI

2.1. Acqua

2.1.1. Quando si fa accenno all'acqua per soluzioni, diluzioni e lavaggi, si intende sempre acqua distillata o acqua demineralizzata di purezza equivalente.

2.1.2. Quando si fa accenno ad una « soluzione » o ad una « diluizione », senza indicazione di altri reattivi, si intende una soluzione acquosa.

2.2. Prodotti chimici

Tutti i prodotti chimici devono essere di purezza analitica, salvo disposizioni contrarie.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Elenco dell'apparecchiatura

L'elenco del materiale si riferisce ad un'attrezzatura per uso specializzato e con requisiti particolari.

3.2. Bilancia analitica

Per bilancia analitica si intende una bilancia della sensibilità di almeno 0,1 mg.

4. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

4.1. Risultati

Il risultato da indicare sul bollettino di analisi è il valore medio ottenuto da almeno due determinazioni di soddisfacente ripetibilità.

4.2. Calcolo della percentuale

Salvo disposizioni speciali, i risultati sono espressi in % (m/m) degli acidi grassi totali, nello stato in cui sono giunti al laboratorio.

4.3. Numero di cifre significative

Il risultato non deve comportare cifre significative in numero maggiore di quanto lo consenta la precisione del metodo.

II. DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ERUCICO

1. CAMPO D'APPLICAZIONE E PORTATA

Il metodo consente di determinare l'acido erucico contenuto :

i) negli oli e nei grassi che contengono acido cetoleico (un isomero cis dell'acido docosenoico presente negli oli di pesce), e

ii) negli oli e nei grassi idrogenati che contengono isomeri cis e trans dell'acido docosenoico.

2. DEFINIZIONE

Tenore di acido erucico : acido erucico determinato con il metodo specificato.

3. PRINCIPIO

Separazione degli esteri metilici degli acidi grassi costitutivi mediante cromatografia su strato sottile al nitrato d'argento effettuata a bassa temperatura e determinazione quantitativa degli esteri separati mediante cromatografia gas-liquido.

4. REATTIVI

4.1. Etere etilico esente da perossidi, di recente distillazione.

4.2. n-esano.

4.3. Gel di silice G, per cromatografia su strato sottile.

4.4. Gel di silice per cromatografia su colonna.

4.5. Nitrato d'argento, soluzione 200 g/l. Sciogliere 24 g di nitrato d'argento in acqua e portare il volume a 120 ml con acqua.

4.6. Soluzione di erucato di metile 5 mg/ml. Sciogliere 50 mg di erucato di metile in alcuni ml di n-esano e portare il volume a 10 ml.

4.7. Tetracosanoato di metile, soluzione per lo standard interno, 0,25 mg/ml. Sciogliere 25 mg di tetracosanoato di metile in alcuni ml di n-esano (vedi 4.6) e diluire a 100 ml in n-esano.

4.8. Solvente di sviluppo. Toluene : esano 90 : 10 (v/v).

4.9. 2,7 diclorofluoresceina, soluzione 0,5 g/l. Sciogliere riscaldando ed agitando 50 mg di 2,7 diclorofluoresceina in 100 ml di soluzione acquosa di metanolo al 50 %.

5. APPARECCHIATURA

5.1. Apparecchiatura per cromatografia su strato sottile, comprendente in particolare :

5.1.1. Surgelatore in grado di mantenere la vasca di sviluppo ed il contenuto a temperature comprese fra meno 20° C e meno 25° C.

5.1.2. Lastre di vetro, 200 mm × 200 mm.

5.1.3. Lampada UV.

5.1.4. Colonna di vetro lunga 200 mm, con diametro interno di 10 mm, munita di filtri di lana di vetro o di vetro sinterizzato, oppure piccoli imbuti con filtri di vetro sinterizzato.

5.1.5. Applicatore per deporre le soluzioni sotto forma di banda o striscia sottile.

5.2. Apparecchiatura per cromatografia gas-liquido, munita di integratore elettronico, come descritta nel capitolo III dell'allegato VI del regolamento (CEE) n. 72/77 della Commissione.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi

Prelevare un campione rappresentativo di circa 400 mg di olio o di grasso e preparare, secondo il metodo descritto al capitolo II.3 dell'allegato VI del regolamento (CEE) n. 72/77 della Commissione, una soluzione esanica contenente circa 20-50 mg/ml di esteri metilici degli acidi grassi.

6.2. Cromatografia su strato sottile

6.2.1. *Preparazione delle lastre*

Introdurre 60 g di gel di silice (4.3) in un pallone a fondo rotondo da 500 ml insieme a 120 ml di soluzione di nitrato d'argento (4.5) e agitare per un minuto fino ad ottenere una poltiglia completamente omogenea. Distribuire la poltiglia nel solito modo sulle lastre, regolando lo spessore su 0,5 mm. Questa quantità di poltiglia è sufficiente per preparare 5 lastre da 200 × 200 mm.

Lasciar seccare parzialmente le lastre all'aria (di preferenza al buio e per circa 30 minuti) sottoponendole successivamente ad un'essiccazione e ad un'attivazione in un forno a 100° C per 2 ore e trenta minuti. Le lastre devono essere utilizzate al più presto dopo l'attivazione, diversamente esse devono essere conservate accuratamente in un armadio buio ed attivate prima dell'uso (osservazione : l'attivazione a 110° C per un'ora può essere ritenuta soddisfacente purché le lastre non siano divenute scure). Prima dell'uso tracciare delle linee attraverso tutto lo spessore dello strato, a 10 mm dai lati e dal vertice di ciascuna lastra, per ridurre l'effetto del bordo durante lo sviluppo.

6.2.2. *Applicazione degli esteri metilici*

Usando l'applicatore (5.1.5), depositare sulla lastra 50 µl della soluzione di esteri metilici (6.1), sotto forma di una striscia stretta della lunghezza di circa 50 mm, distante almeno 40 mm dal lato della lastra e 10 mm dal fondo. Applicare in modo analogo 100 µl di una soluzione contenente volumi uguali della soluzione di esteri metilici (6.1) e della soluzione di erucato di metile (4.6). È necessaria un'attenzione particolare durante l'applicazione delle soluzioni a causa della fragilità dello strato. Dopo l'applicazione degli esteri metilici, il bordo inferiore della lastra può essere lasciato nell'etere dietilico sino a che l'etere risale a circa 5 mm sopra l'area su cui è applicato il campione. In questo modo gli esteri metilici si concentreranno in una fascia stretta. Note : Si possono applicare 50 µl della soluzione di erucato di metile (4.6) sulla lastra per facilitare l'identificazione della banda di erucato di metile dopo lo sviluppo (vedi figura).

6.2.3 *Sviluppo delle lastre*

Versare nella vasca di sviluppo una quantità di solvente di sviluppo (4.8) sufficiente ad ottenere una profondità di circa 5 mm e disporre la vasca, completa di coperchio, in un surgelatore (5.1.1) a meno 25° C o quanto più vicino possibile a questa temperatura (talvolta può essere opportuno rivestire internamente la vasca con carta da filtro). Dopo 2 ore, porre con precauzione la lastra nella vasca e lasciare che il solvente salga sino a circa metà o due terzi dell'altezza della lastra. Togliere la lastra e farne cautamente evaporare il solvente in corrente di azoto. Rimettere la lastra nella vasca e lasciare che il solvente ne raggiunga la sommità. Togliere la lastra, essiccarla come sopra in corrente di azoto e spruzzarla con la soluzione di 2,7 diclorofluoresceina (4.9).

Osservando la lastra alla luce ultravioletta è possibile localizzare la banda di erucato di metile nel campione prendendo come riferimento la striscia più intensa del campione addizionato di erucato di metile.

6.2.4. *Separazione delle frazioni di esteri metilici*

Raschiare quantitativamente la banda del metile erucato proveniente dal campione raccogliendola in un becher da 50 µl. Raschiare quantitativamente il gel di di silice sopra e sotto la banda del metile erucato che contiene tutte le altre frazioni di esteri metilici degli acidi grassi, raccogliendola in un altro becher da 50 ml. Aggiungere a ciascun becher 1,0 ml della soluzione standard di tetracosanoato di metile (4.7) e 10 ml di etere etilico (4.1). Mescolare e versare separatamente i contenuti dei becher nelle colonne o nei filtri (5.1.4) contenenti circa 1 g di gel di silice (4.4) ed estrarre gli esteri usando 3 o 4 porzioni da 10 ml di etere etilico. Raccogliere i filtrati in piccole beute. Evaporare a piccolo volume i filtrati sotto lieve corrente di azoto e trasferirli in provette di vetro con fondo a punta. Evaporare tutto il solvente in corrente di azoto in modo che gli esteri metilici si concentrino sul fondo delle provette. Sciogliere gli esteri metilici in 25-50 ml di esano (4.2).

6.3. **Cromatografia gas-liquido**

6.3.1. Procedere come indicato al capitolo III dell'allegato VI del regolamento (CEE) n. 72/77 della Commissione e iniettare 1-2 µl delle soluzioni di esteri metilici ottenuti :

(i) dalla frazione che contiene l'erucato di metile ;

(ii) dalle frazioni che contengono i rimanenti esteri metilici degli acidi grassi.

6.3.2. Con l'integratore elettronico, ricavare le aree dei seguenti picchi :

(i) dal cromatogramma della frazione contenente l'erucato di metile :

a) erucato di metile [E] ;

b) standard interno [L_1] ;

c) area totale dei picchi degli esteri metilici, escluso lo standard interno [EF] ;

(ii) dal cromatogramma delle frazioni contenenti i rimanenti esteri metilici degli acidi grassi :

a) area totale dei picchi escluso lo standard interno [RF] ;

b) standard interno [L_2].

7. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

7.1. **Metodo di calcolo e formula**

7.1.1. Il tenore di acido erucico del campione, espresso in estere metilico, come percentuale degli esteri metilici degli acidi grassi totali preparati dal campione, è calcolato :

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

dove :

E, EF, RF, L_1 e L_2 = aree dei picchi di cui al punto 6.3.2, corrette se necessario con gli opportuni fattori di calibrazione. Il tenore in erucato di metile, ottenuto con la formula sopraindicata, è equivalente al tenore dell'acido erucico espresso in percentuale del contenuto totale in acidi grassi.

7.1.2. Quando l'area del picco è espressa in percentuale, calcolare EF e RF nel modo seguente :

$EF = 100 - L_1$

$RF = 100 - L_2$

7.1.3. Il procedimento di calcolo (7.1.1) suppone che il tenore di acido tetracosanoico nel campione sia trascurabile. Qualora fosse presente una certa quantità di detto acido, il valore in acido tetracosanoico (L_2) ottenuto con il cromatogramma delle frazioni contenenti gli altri esteri metilici di acidi grassi può essere ridotto a :

$L_2 - T_2$

dove :

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

e

T_2 = area del picco dell'estero metilico dell'acido tetracosanoico proveniente dal campione che costituisce una parte dell'area del picco imputata allo standard interno nel cromatogramma della frazione contenente i rimanenti esteri metilici degli acidi grassi.

P_2 = area del picco dell'estero metilico dell'acido palmitico ottenuto dal cromatogramma della frazione restante.

T_0 = area del picco dell'estero metilico dell'acido tetracosanoico ottenuta dal cromatogramma degli esteri metilici degli acidi grassi totali determinati con l'analisi di cui all'articolo 2 della direttiva.

P_0 = area del picco dell'estero metilico dell'acido palmitico ottenuta dal cromatogramma degli esteri metilici degli acidi totali determinati con l'analisi di cui all'articolo 2 della direttiva.

7.1.4. *Derivazione della formula*

Il tenore in acidi grassi della frazione che contiene l'erucato di metile, espresso come percentuale degli acidi grassi totali contenuti nel campione, è dato dalla seguente formula :

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

Il tenore in acido erucico della frazione che contiene l'erucato di metile è dato dalla seguente formula :

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

Pertanto, il tenore in acido erucico del campione, espresso come percentuale del tenore totale degli acidi grassi, è dato dalla relazione :

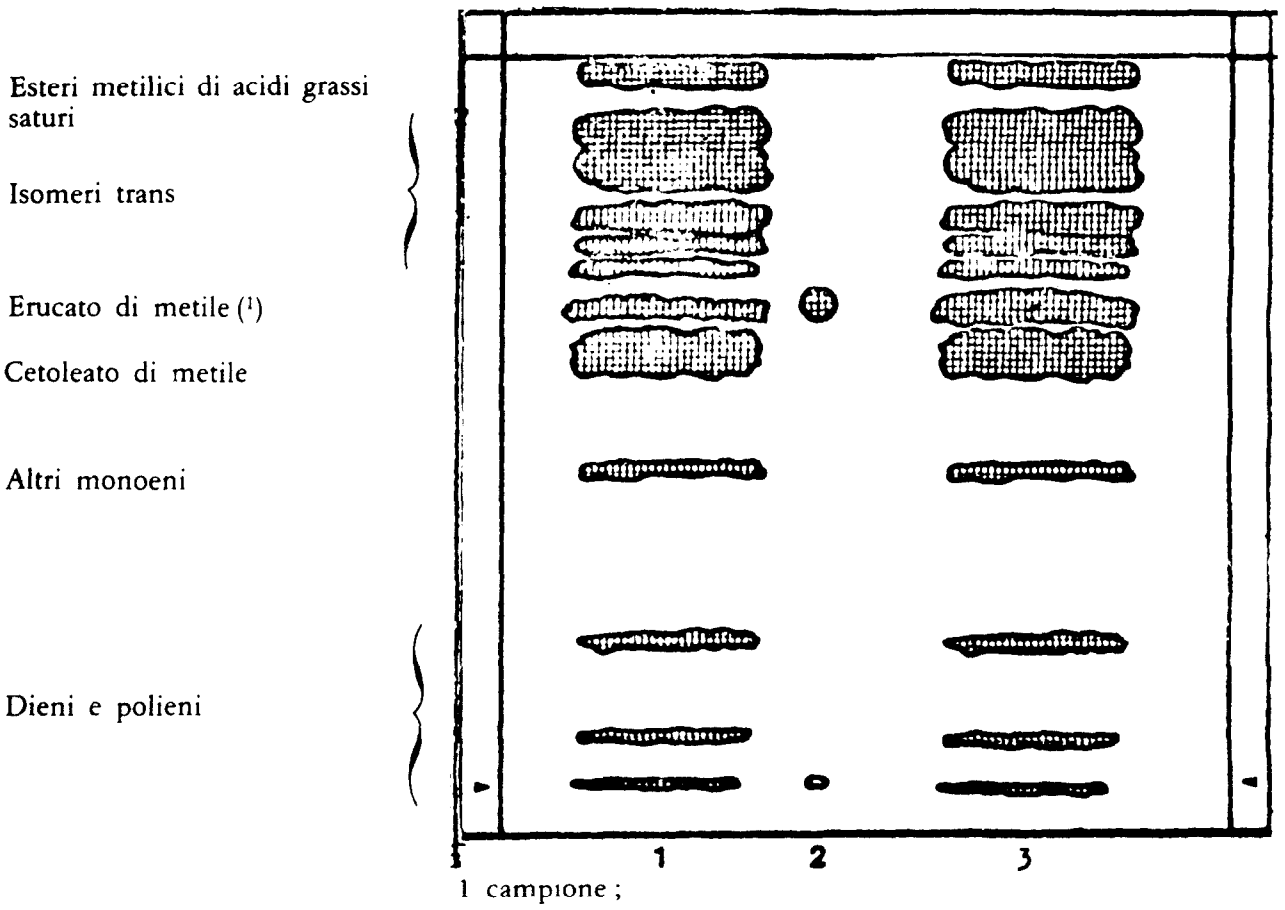
$$L_1\left(\frac{EF}{\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}}\right) \times \frac{E}{EF} \times 100 \quad \text{ovvero} \quad \frac{E}{L_1\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times 100$$

7.1.5. *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate simultaneamente, nelle stesse condizioni, dalla stessa persona e sullo stesso campione, non deve superare, in valore relativo, 10 % del valore determinato, e, in valore assoluto, 0,5 g per 100 g del campione, prendendo il valore più grande.

FIGURA

Tipico esempio di frazionamento su strato sottile che mostra la separazione fra metile erucato, cetoleato e altri isomeri dell'acido docosenoico



1 campione ;
2 erucato di metile ;
3 campione + metile erucato

(1) La frazione indicata come erucato di metile conterrà normalmente esteri metilici di altri acidi monoenoici, ma dovrebbe essere esente da cetoleato di metile.