

31980L0891

27.9.1980

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

L 254/35

DIREKTIVA KOMISIJE**z dne 25. julija 1980****o analitski metodi Skupnosti za določanje vsebnosti eruka kisline v oljih in masteh, namenjenim prehrani ljudi ter v živilih, ki so jim dodana olja in masti**

(80/891/EGS)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 76/621/EGS z dne 20. julija 1976 o določitvi zgornje mejne vrednosti eruka kisline v oljih in masteh, namenjenih prehrani ljudi ter živilih, ki so jim dodana olja in masti ⁽¹⁾, in zlasti člena 3 Direktive,

ker člen 2 Direktive 76/621/EGS določa, da najpozneje od 1. julija 1979 vsebnost eruka kisline v proizvodih iz člena 1 navedene direktive, računano glede na skupno vsebnost maščobnih kislin v maščobni komponenti, ne sme presežati 5 %;

ker člen 3 Direktive 76/621/EGS predpisuje, da se eruka kislina določa po analitski metodi Skupnosti;

ker Uredba (EGS) št. 1470/68 z dne 23. septembra 1968 o jemanju in zmanjševanju vzorcev in določanju vsebnosti olja, nečistoč in vlage v oljnicah ⁽²⁾ opredeljuje v Prilogi VI analitsko metodo, ki jo uvaja Uredba (EGS) št. 72/77 ⁽³⁾, za določanje vsebnosti eruka kisline v semenih oljne ogrščice in oljne repice; ker naj bi se ta metoda uporabljala kot metoda izločilne analize;

ker pri analizi s plinsko-tekočinsko kromatografijo sestavin maščobnih kislin olj in masti pri običajnih pogojih ni mogoče razlikovati eruka kisline od drugih izomerov dokozenojske kisline kakor na primer cetoleinske kisline;

ker moramo določiti vsebnost eruka kisline v oljih in masteh ter živilih, ki so jim dodana olja in masti, ki bi lahko vsebovala cetoleinsko kislino in druge izomere dokozenojske kisline;

ker ni treba določati eruka kisline v oljih in masteh ter živilih, ki so jim dodana olja in masti, potem ko je bilo po metodi izločilne analize ugotovljeno, da skupna vsebnost dokozenojske kisline ali cis-dokozenojske kisline ne presega 5 %;

ker do izdelave natančnejše analitske metode za določanje eruka kisline ta metoda velja za zdaj najprimernejšo;

ker so ukrepi, predvideni s to direktivo, v skladu z mnenjem Stalnega odbora za živila,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Države članice predpišejo, da se analiza za določanje vsebnosti eruka kisline v proizvodih iz člena 1 Direktive 76/621/EGS izvede v skladu s členom 2.

Člen 2

1. Za izločilno analizo se določi ena od naslednjega:

- (a) skupna vsebnost dokozenojske kisline v proizvodih iz člena 1 po metodi, opisani v Prilogi VI k Uredbi (EGS) št. 1470/68; ali
- (b) skupna vsebnost cis-dokozenojske kisline v proizvodih iz člena 1 po metodi, opisani v Prilogi VI k Uredbi (EGS) št. 1470/68, s plinsko kromatografijo v pogojih, ki omogočajo ločitev cis- in trans-izomerov dokozenojske kisline; primerne stacionarne faze so na primer cianopropilpolisiloksani ali tekoči kristali.

2. Če skupna vsebnost:

- (a) dokozenojske kisline, določena v skladu z odstavkom 1(a), ali
- (b) cis- dokozenojske kisline, določena v skladu z odstavkom 1(b) v proizvodih iz člena 1, računana glede na skupno

⁽¹⁾ UL L 202, 28.7.1976, str. 35.

⁽²⁾ UL L 239, 28.9.1968, str. 2.

⁽³⁾ UL L 12, 15.1.1977, str. 11.

vsebnost maščobnih kislin v maščobni komponenti, ne presega 5 %, ni potrebno nadaljnje določanje. Sicer se mora vsebnost eruka kisline določiti po metodi, opisani v Prilogi k tej direktivi.

Člen 3

Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za uskladitev s to direktivo, najpozneje do 1. februarja 1982. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Člen 4

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 25. julija 1980

Za Komisijo

Étienne DAVIGNON

Član Komisije

PRILOGA

DOLOČANJE VSEBNOSTI ERUKA KISLINE V OLJIH IN MASTEH, NAMENJENIH PREHRANI LJUDI TER ŽIVILIH, KI SO JIM DODANA OLJA ALI MASTI**I. UVOD****1. PRIPRAVA VZORCA****1.1 Splošno**

Masa vzorca, predloženega laboratoriju v analizo, je običajno 50 g, razen če ni zahtevana večja količina.

1.2 Priprava vzorca za analizo v laboratoriju

Preden se vzorec analizira, ga moramo homogenizirati.

1.3 Posode

Tako pripravljeni vzorec shranimo v zračnotesni in vodotesni posodi.

2. REAGENTI**2.1 Voda**

2.1.1 Za raztapljanje, razredčevanje ali izpiranje se mora uporabljati destilirana ali najmanj prav tako čista demineralizirana voda.

2.1.2 Če reagent ni posebej določen, pomeni „raztopina“ ali „razredčevanje“ vodno raztopino oziroma razredčenje z vodo.

2.2 Kemikalije

Če ni drugače določeno, moramo uporabljati kemikalije priznane analitske kakovosti.

3. APARATI**3.1 Seznam aparatov**

Seznam obsega samo tako opremo, ki je namenjena posebni uporabi in ima specifikacijo.

3.2 Analitska tehtnica

„Analitska tehtnica“ pomeni tehtnico s točnostjo 0,1 mg ali boljše.

4. PODAJANJE REZULTATOV**4.1 Rezultati**

Rezultati, ki se navedejo v uradnem poročilu o analizi, morajo biti srednje vrednosti najmanj dveh določitev, katerih ponovljivost je zadovoljiva.

4.2 Izračun odstotkov

Če ni drugače določeno, rezultate izrazimo v odstotkih (m/m) skupnih maščobnih kislin v vzorcu, ki je bil laboratoriju predložen.

4.3 Število pomembnih decimalnih mest

Natančnost podanega rezultata (število pomembnih decimalnih mest) je odvisna od natančnosti metode.

II. DOLOČITEV ERUKA KISLINE

1. PREDMET IN PODROČJE UPORABE METODE

Z metodo se določa vsebnost eruka kisline:

- (i) v oljih in masteh, ki vsebujejo cetoleinsko kislino (poseben cis-izomer dokozenojske kisline, ki se pojavlja v ribjih oljih), in
- (ii) v hidrogeniranih oljih in masteh, ki vsebujejo trans- in cis-izomere dokozenojske kisline.

2. OPREDELITEV POJMA

Vsebnost eruka kisline: vsebnost eruka kisline, kakor je določena z opredeljeno metodo.

3. PRINCIP

Metilestre maščobnih kislin, ki sestavljajo olje ali masti, ločimo z nizko temperaturno argentometrično tankoplastno kromatografijo in jih kvantitativno določimo s plinsko kromatografijo.

4. REAGENTI

- 4.1 Sveže destilirani dietileter brez peroksidov.
- 4.2 n-heksan.
- 4.3 Silikagel G za tankoplastno kromatografijo.
- 4.4 Silikagel za kolonsko kromatografijo.
- 4.5 Raztopina srebrovega nitrata, 200 g/liter. Raztopimo 24 g srebrovega nitrata v vodi in dopolnimo z vodo do 120 ml.
- 4.6 Raztopina metilerukata, 5 mg/ml. Raztopimo 50 mg metilerukata v nekaj ml n-heksana in razredčimo na 10 ml z n-heksanom.
- 4.7 Metiltetrakozanoat, interna standardna raztopina, 0,25 mg/ml. Raztopimo 25 mg metiltetrakozanoata v nekaj ml n-heksana (kakor pod točko 4.6) in razredčimo na 100 ml z n-heksanom.
- 4.8 Topilo za razvijanje. Toluen: n-heksan 90: 10 (v/v).
- 4.9 Raztopina 2,7 diklorofluoresceina, 0,5 g/liter. Raztopimo ob segrevanju in mešanju 50 mg 2,7 diklorofluoresceina v 100 ml 50 % raztopine metanola v vodi.

5. APARATI

- 5.1 Aparat za tankoplastno kromatografijo, ki obsega zlasti:
 - 5.1.1 Enoto za globoko zamrzovanje, ki ohranja posodo za razvijanje in vsebino pri temperaturi od minus 20 do minus 25 °C.
 - 5.1.2 Steklene ploščice, 200 x 200 mm.
 - 5.1.3 Ultravijolična svetilka.
 - 5.1.4 Steklene kolone, dolge približno 200 mm, notranji premer približno 10 mm, s filtrom iz steklene volne ali sintranega stekla. Alternativno, majhni liji s sintranim steklenim filtrom.
 - 5.1.5 Nanašalec za nanašanje raztopin v obliki ozkih trakov ali prog na ploščicah TLC.
- 5.2 Plinski kromatograf z elektronskim integratorjem, kakor je opisan v oddelku III Priloge VI k Uredbi Komisije (EGS) št. 72/77.

6. POSTOPEK

6.1 Priprava metilestrov maščobnih kislin

Odtehamo približno 400 mg vzorca olja ali masti za analizo in pripravimo raztopino, ki vsebuje približno 20 do 50 mg/ml metilestrov maščobnih kislin v n-heksanu po metodi, opisani v oddelku II.3 Priloge VI k Uredbi Komisije (EGS) št. 72/77.

6.2 Tankoplastna kromatografija

6.2.1 Priprava plošč

60 g silikagela (4.3) v 500 ml bučki z okroglim dnom dodamo 120 ml raztopine srebrovega nitrata (4.5) in stresamo eno minuto, da dobimo popolnoma homogeno suspenzijo. Suspenzijo nanesemo na plošče kakor običajno; debelina plasti naj bi bila približno 0,5 mm. Ta količina suspenzije je dovolj za pripravo petih plošč 200 x 200 mm.

Pustimo, da se ploščice delno posušijo na zraku (najbolje je, če jih pustimo v temi približno 30 minut). Nato jih popolnoma posušimo in aktiviramo tako, da jih položimo v sušilnik pri temperaturi 100 °C za 2 uri in 30 minut. Ploščice uporabimo, kakor hitro je mogoče, po aktiviranju ali pa jih pazljivo skladiščimo v temni omari in jih nato ponovno aktiviramo pred uporabo. (Opomba: aktiviranje pri 110 °C, ki traja eno uro, je lahko zadovoljivo, če ploščice ne potemnijo.) Pred uporabo zarežemo črte skozi premaz 10 mm od strani in od zgornjega roba plošče, da se zmanjšajo robni učinki med razvijanjem.

6.2.2 Nanašanje metilestrov na ploščice TLC

Z nanašalcem (5.1.5) nanesemo 50 µl raztopine metilestrov (6.1), pripravljenih iz vzorca v obliki približno 50 mm dolge ozke proge, najmanj 40 mm od strani in 10 mm od dna plošče. Podobno nanesemo 100 µl raztopine, ki vsebuje enake prostornine pripravljene raztopine metilestrov (6.1) in raztopino metilerukata (4.6). Med nanašanjem raztopin moramo biti še posebno pazljivi zaradi krhke narave premaza. (Opomba: Če želimo, lahko 50 µl raztopine metilerukata (4.6) nanesemo na ploščo za pomoč pri identifikaciji traka metilerukata po razvijanju: glej sliko.) Po nanosu metilestrov postavimo spodnji rob plošče v dietileter, dokler se eter ne povzpne približno 5 mm nad področje nanosa vzorca. To koncentrira metilestre v ozek pas.

6.2.3 Razvijanje plošč

V posodo nalijemo topilo za razvijanje (4.8) do globine približno 5 mm in položimo posodo s pokrovom v zamrzovalno skrinjo (5.1.1) pri temperaturi minus 25 °C oziroma najbližji mogoči temperaturi. (V nekaterih primerih je bolje, če podložimo posodo.) Po dveh urah previdno namestimo ploščo v posodo in počakamo, da se topilo dvigne na približno polovico do 2/3 višine plošče. Odstranimo ploščo, s katere naj topilo nežno izhlapi pod rahlim tokom dušika. Ponovno postavimo ploščo v posodo in počakamo, da se raztopina dvigne do vrha plošče. Odstranimo ploščo in jo kakor prej posušimo pod rahlim tokom dušika, nato po njej previdno razpršimo raztopino 2,7 diklorofluoresceina (4.9).

Ploščo pregledamo pod ultravijolično svetlobo in lociramo trak, ki vsebuje metilerukat v vzorcu glede na okrepljeni pas primerjalnega vzorca, ki mu je bil dodan metilerukat (glej sliko).

6.2.4 Ločevanje frakcij metilestrov

Spraskamo trak metilerukata z vzorca v 50 ml čašo in pazimo, da ni izgub. Podobno prenesemo silikagel, ki je nad trakom metilerukata in pod njim, v drugo 50 ml čašo. Ta trak vsebuje vse druge frakcije metilestrov maščobnih kislin. Dodamo 1,0 ml standardne raztopine metiltetrakozanoata (4.7) in 10 ml dietiletra (4.1) v vsako čašo. Premešamo in prenesemo vsebino čaš v ločene kolone ali lijake (5.1.4), od katerih vsak vsebuje približno 1 g silikagela (4.4); s tremi ali štirimi 10 ml alikvotnimi deli dietiletra speremo metilestre. Zberemo filtrate v majhnih bučkah. Pod rahlim tokom dušika vsak filtrat uparimo do majhne prostornine, nato prenesemo metilestre v majhne steklene epruvete s koničastim dnom. Z izhlapevanjem pod rahlim tokom dušika odparimo vse topilo tako, da se metilestri koncentrirajo na dnu epruvet. Metilestre raztopimo v približno 25 do 50 µl n-heksana (4.2).

6.3 Plinska kromatografija

6.3.1 Opravimo postopek, opisan v oddelku III Priloge VI Uredbe Komisije 72/77/EGS, in analiziramo 1 do 2 μ l raztopin metilestrov, dobljenih iz (i) frakcije, ki vsebuje metilerukat in (ii) iz frakcij, ki vsebujejo preostale metilirane maščobne kisline.

6.3.2 Iz elektronskega integratorja dobimo naslednje površine kromatografskih vrhov:

- (i) iz kromatograma frakcije, ki vsebuje metilerukat:
 - (a) metilerukat [E]
 - (b) interni standard [L_1]
 - (c) skupno površino kromatografskih vrhov metilestrov brez internega standarda [EF]
- (ii) iz kromatograma frakcij, ki vsebujejo preostale metilestre maščobnih kislin:
 - (a) skupno površino kromatografskih vrhov metilestrov brez internega standarda [RF]
 - (b) interni standard [L_2]

7. PODAJANJE REZULTATOV

7.1 Metoda računanja in formula

7.1.1 Vsebnost eruka kisline v vzorcu, izražena v obliki metilestra kot odstotek skupnih metilestrov maščobnih kislin, pripravljenih iz vzorca, je podana z:

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

pri čemer so

E, EF, RF, L_1 in L_2 površine kromatografskih vrhov, navedene v 6.3.2, po potrebi popravljene z uporabo umeritvenih faktorjev.

Za praktične namene je vrednost metilerukata, podana z gornjo formulo, enakovredna vsebnosti eruka kisline, izražene kot odstotek skupne vsebnosti maščobnih kislin v vzorcu.

7.1.2 Če imamo podane površine kromatografskih vrhov v procentih, se vrednosti za EF in RF lahko izračunajo:

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2$$

7.1.3 Metoda izračunavanja (7.1.1) predpostavlja, da je vsebnost tetrakozanojske kisline v vzorcu zanemarljiva. Če se pokaže, da je vsebnost te kisline v vzorcu znatna, moramo vsebnost za tetrakozanojsko kislino (L_2), ki smo jo dobili iz kromatograma preostale frakcije, zmanjšati na:

$$L_2 - T_2,$$

pri čemer je

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

in

T_2 = površina kromatografskega vrha metiltetrakozanoata, dobljena iz vzorca, in tvori del površine kromatografskega vrha, ki pripada internemu standardu v kromatogramu preostale frakcije metilestrov maščobnih kislin,

P_2 = površina kromatografskega vrha metilpalmitata, dobljena iz kromatograma preostale frakcije,

T_0 = površina kromatografskega vrha metiltetrakozanoata, ki smo jo dobili iz kromatograma metilestrov skupnih maščobnih kislin, kakor je določeno z analizo iz člena 2 te direktive,

P_0 = površina kromatografskega vrha metilpalmitata, ki smo jo dobili iz kromatograma metilestrov skupnih maščobnih kislin, kakor je določeno z analizo iz člena 2 te direktive.

7.1.4 Izpeljava formule

Delež maščobnih kislin v frakciji, ki vsebuje metilerukat, izražen kot odstotek skupnih maščobnih kislin v vzorcu, je podano z:

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

Delež eruka kisline v frakciji, ki vsebuje metilerukat, je podan z:

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

Torej je vsebnost eruka kisline v vzorcu, izražena kot odstotek skupnih maščobnih kislin, podana z:

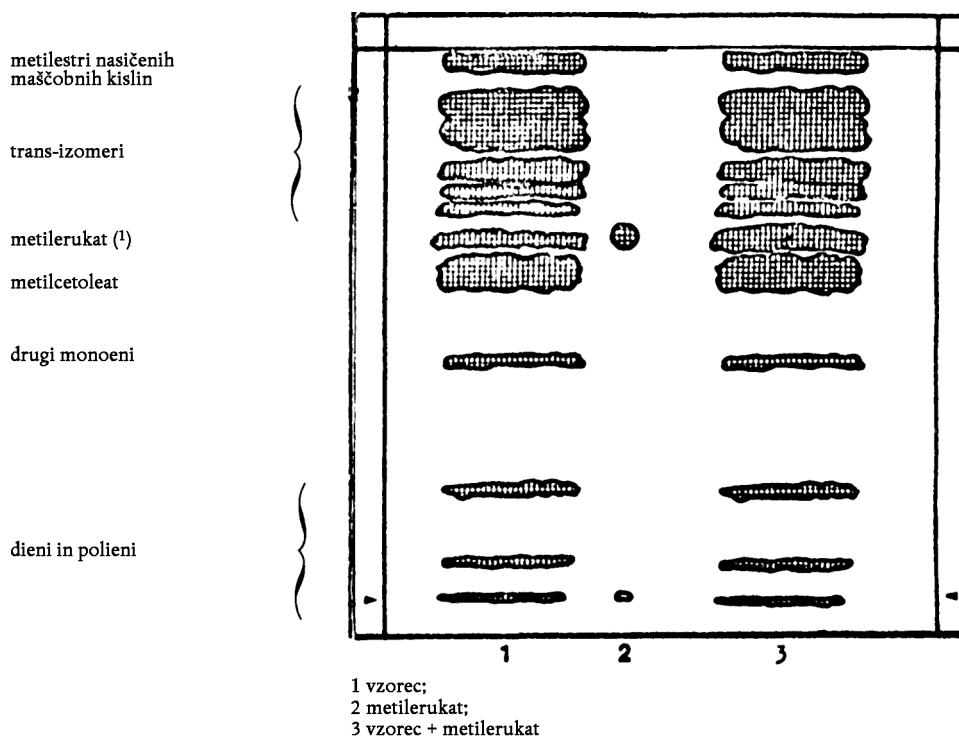
$$\frac{\frac{EF}{L_1 \left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2} \right)} \times \frac{E}{EF} \times 100 \quad \text{ali} \quad \frac{E}{L_1 \left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2} \right)} \times 100$$

7.1.5 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki ju izvede hkrati ali hitro v zaporedju na enakem vzorcu isti analitik pod enakimi pogoji, ne sme presegati 10 % rezultata ali 0,5 g na 100 g vzorca, upoštevajoč večjo vrednost.

SLIKA

Primer tankoplastnega kromatograma, ki prikazuje ločevanje metilestrov eruka kisline, cetoleinske kisline in trans-izomera dokozenojske kisline.



(1) Frakcijsko označeni metilerukat navadno vsebuje metilestre drugih monoenskih kislin, vendar v njem ne sme biti metilcetoleata.