

KOMMISSIONENS DIREKTIV

af 25. juli 1980

om fællesskabsanalysemetoden til bestemmelse af indholdet af erucasyre i olier og fedtstoffer, der uden yderligere forarbejdning er bestemt til konsum, samt i fødevarer, der tilsættes olier eller fedtstoffer

(80/891/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det europæiske økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 76/621/EØF af 20. juli 1976 om fastsættelse af det maksimale indhold af erucasyre i olier og fedtstoffer, der uden yderligere forarbejdning er bestemt til konsum, samt i fødevarer, der tilsættes olier eller fedtstoffer⁽¹⁾, særlig artikel 3, og

ud fra følgende betragtninger:

I artikel 2 i direktiv 76/621/EØF fastsættes det, at fra den 1. juli 1979 må indholdet af erucasyre i de i artikel 1 i nævnte direktiv omhandlede produkter, beregnet på grundlag af det samlede fedtsyreindhold i de fedtstoffer, de indeholder, ikke overstige 5 %;

i artikel 3 i direktiv 76/621/EØF fastsættes det, at indholdet af erucasyre skal kontrolleres efter en fællesskabsanalysemetode;

I Kommissionens forordning (EØF) nr. 1470/68 af 23. september 1968 om udtagelse og reduktion af prøver samt om bestemmelse af indholdet af olie, urenheder og fugtighed i olieholdige frø⁽²⁾, fastsættes i bilag VI, indsat ved forordning (EØF) nr. 72/77⁽³⁾, en analysemetode til bestemmelse af indholdet af erucasyre i raps- og rypsfø; denne metode bør anvendes ved forudvælgelse;

under normale betingelser for analyse af olie- og fedtstoffer ved gasvæskechromatografi af bestanddelen af fede syrer er det ikke muligt at skelne mellem erucasyre og andre isomere af docosensyre som f.eks. cetoleinsyre;

det er nødvendigt at bestemme erucasyreniveauet i olier og fedtstoffer samt i levnedsmidler tilsat olier eller fedtstoffer, som kan indeholde cetoleinsyre og andre isomere af docosensyre;

det er ikke nødvendigt at bestemme erucasyreniveauet i olier og fedtstoffer samt i levnedsmidler tilsat olier

og fedtstoffer, som ved en foreløbig analyse viser sig at indeholde maksimalt 5 % docosensyre eller 5 % cis-docosensyre;

denne analysemetode anses for den mest hensigtsmæssige i øjeblikket, indtil der fastlægges en analysemetode, der tillader en mere nøjagtig bestemmelse af erucasyre;

de i dette direktiv fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelsen fra Den stående Levnedsmiddelkomité —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Medlemsstaterne foreskriver, at de nødvendige analyser til bestemmelse af erucasyreindholdet i de i artikel 1 i direktiv 76/621/EØF nævnte produkter udføres i overensstemmelse med artikel 2.

Artikel 2

1. Som forudvælgelse bestemmes
 - a) enten totalindholdet af fede docosensyrer i de i artikel 1 nævnte produkter bestemt ved den i bilag VI til forordning (EØF) nr. 1470/68 beskrevne metode,
 - b) eller totalindholdet af fede cis-docosensyrer i de i artikel 1 nævnte produkter bestemt ved den i bilag VI til forordning (EØF) nr. 1470/68 beskrevne metode under anvendelse af gasvæskechromatografi under sådanne betingelser at cis- og trans-isomerer af docosensyrer adskilles; de velegnede stationære faser for denne analyse er f.eks. af typen »cyanopropylpolysiloxan« eller flydende krystaller.
2. Hvis totalindholdet
 - a) af fede docosensyrer bestemt i overensstemmelse med stk. 1, litra a), eller
 - b) af fede cis-docosensyrer bestemt i overensstemmelse med stk. 1, litra b),

⁽¹⁾ EFT nr. L 202 af 28. 7. 1976, s. 35.

⁽²⁾ EFT nr. L 239 af 28. 9. 1968, s. 2.

⁽³⁾ EFT nr. L 12 af 15. 1. 1977, s. 11.

i de i artikel 1 nævnte produkter, beregnet på totalindholdet af fede syrer i den fede fase, ikke overstiger 5 % behøves ingen anden bestemmelse. I modsat fald bestemmes indholdet af erucasyre efter den metode, der er angivet i bilaget.

Artikel 3

Medlemsstaterne sætter de nødvendige love og administrative bestemmelser i kraft for senest den 1. februar 1982 at efterkomme dette direktiv. De underretter straks Kommissionen herom.

Artikel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 25. juli 1980.

På Kommissionens vegne

Étienne DAVIGNON

Medlem af Kommissionen

BILAG**BESTEMMELSE AF INDHOLDET AF ERUCASYRE I OLIER OG FEDTSTOFFER, DER UDENYDERLIGERE FORARBEJDNING ER BESTEMT TIL KONSUM, SAMT I FØDEVARER, DER TILSÆTTES OLIER ELLER FEDTSTOFFER****I. INDLEDNING****1. PRØVEFORBEREDELSE****1.1. Generelt**

Analyseprøvens masse skal normalt være på 50 g, medmindre en større mængde er nødvendig til en specifik bestemmelse.

1.2. Prøveforberedelse

Prøven bør homogeniseres forud for analysen.

1.3. Opbevaring

Den således forberedte prøve bør altid opbevares i en lufttæt beholder.

2. REAGENSER**2.1. Vand**

2.1.1. Når der er tale om vand til opløsning, fortyndinger og vaskning, drejer det sig altid om destilleret vand eller demineraliseret vand af mindst tilsvarende renhed.

2.1.2. Når der er tale om en »opløsning« eller en »fortyndning«, er der, hvor intet andet er angivet, tale om en vandig opløsning.

2.2. Kemikalier

Alle kemikalier skal, hvor intet andet er oplyst, være af analyseren kvalitet.

3. APPARATUR**3.1. Apparatfortegnelse**

Apparatfortegnelsen omfatter specialapparat med særlige specifikationer.

3.2. Analysevægt

Analysevægtens følsomhed skal være på 0,1 mg eller bedre.

4. ANGIVELSE AF RESULTATER**4.1. Resultater**

Det på analyseattesten nævnte resultat er et gennemsnit på grundlag af mindst to bestemmelser, hvis gentagelighed er tilfredsstillende.

4.2. Procentberegning

Medmindre andet er fastsat, udtrykkes resultaterne i procent (m/m) af den samlede mængde af fedtsyrer i prøven, således som laboratoriet har modtaget den.

4.3. Antal betydende cifre

Resultatet må kun angives med så mange betydende cifre, som metodens præcision giver mulighed for.

II. BESTEMMELSE AF ERUCASYRE

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Med samme metode er det muligt at bestemme indholdet af erucasyre i :

- a) Olier og fedtstoffer indeholdende cetoleinsyre (en cis-isomer af C₂₂-syre, som forekommer i fiskeolier), og
- b) Hærdede olier og fedtstoffer indeholdende trans- og cis-isomer af C₂₂-syre.

2. DEFINITION

Indhold af erucasyre : erucasyre bestemt efter den her angivne metode.

3. PRINCIP

Adskillelse af methylesterne af fede syrer ved tyndtlags chromatografi ved lav temperatur og sølvnitratimpregnering samt kvantitativ bestemmelse af de adskilte estere ved gas-væskechromatografi.

4. REAGENSER

- 4.1. Diethylether, friskdestilleret peroxidfri.
- 4.2. n-Hexan
- 4.3. Kieselgel G til tyndtlagschromatografi
- 4.4. Kieselgel til søjlechromatografi
- 4.5. Sølvnitratopløsning, 200 g/l. Opløs 24 g sølvnitrat i vand og fyldt op til 120 ml med vand.
- 4.6. Methylerucatopløsning (5 mg/ml). 50 mg methylerucat opløses i nogle ml n-Hexan og fortyndes til 10 ml med n-Hexan.
- 4.7. Methyltetracosanoat, intern standardopløsning, 0,25 mg/ml. 25 mg methyltetracosanoat opløses i nogle ml n-Hexan (som i pkt. 4.6) og fortyndes til 100 ml med n-Hexan.
- 4.8. Udviklingsvædske : Toluen og n-Hexan 90 :10 (v/v).
- 4.9. 2,7 dichlorofluoresceinopløsning, 0,5 g/l. 50 mg 2,7 dichlorofluorescein opløses under opvarmning og omrøring i 100 ml af en 50 % vandig methanolopløsning.

5. APPARATUR

- 5.1. Apparat til tyndtlags chromatografi, bestående af :
 - 5.1.1. En dybfryser, som er i stand til at holde udviklingstanken og dennes indhold på en temperatur på minus 20°C til minus 25°C.
 - 5.1.2. Glasplader, 200 mm × 200 mm.
 - 5.1.3. Ultraviolet lampe.
 - 5.1.4. En glassøjle, 200 mm lang og med en indvendig diameter på 10 mm, forsynet med filtre af glasuld eller sintret glas, eller små trage med filtre af sintret glas.
 - 5.1.5. Applikator til anbringelse af opløsninger i form af et snævert bånd eller en streng på en tyndtlagsplade.
- 5.2. Apparat til gas-væskechromatografi sammen med en elektronisk integrator som beskrevet i afsnit III i bilag VI til forordning (EØF) nr. 72/77.

6. FREMGANGSMÅDE

6.1. Fremstilling af fedtsyremethylestere

Der udtages en repræsentativ prøve på ca. 400 mg olie eller fedt og fremstilles en opløsning indeholdende ca. 25-50 mg/ml fedtsyremethylestere i hexan efter den metode, der er beskrevet i afsnit II 3 i bilag VI til forordning (EØF) nr. 72/77.

6.2. Tyndlagschromatografi

6.2.1. Tilberedelse af plader

60 g silicagel (4.3) anbringes i en 500 ml rundbundet kolbe sammen med 120 ml sølvnitratopløsning (4.5) og rystes i et minut for at opnå en fuldstændigt homogen opslemning. Opslemningen udbredes på normal måde på pladerne, idet lagtykkelsen afpasses til 0,5 mm. Denne mængde opslemning er tilstrækkelig til forberedelse af fem 200 x 200 mm plader.

Man lader pladerne tørre delvis i luften (helst i mørke i ca. 30 minutter), hvorefter de tørres helt og aktiveres i en ovn ved 100 C to timer og 30 minutter. Pladerne bør benyttes snarest muligt efter aktivering, i det de ellers må opbevares omhyggeligt i et mørkt skab og aktiveres inden brugen. NB: aktivering ved 110 C i en time kan vise sig at være tilstrækkelig, forudsat at pladerne ikke er blevet mørke). Der trækkes linjer gennem belægningen 10 mm fra siderne og fra toppen af hver plade inden brugen for at reducere kanteffekter under fremkaldelsen.

6.2.2. Applikering af methylestere

Ved hjælp af applikatoren (5.1.5.) anbringes 50µl af den forberedte prøve af methylesteropløsning (6.1.) i en smal streg ca. 50 mm lang, mindst 40 mm fra siden af pladen og 10 mm fra bunden. På lignende måde applikeres 100µl af en opløsning indeholdende lige rumfang af den forberedte methylesteropløsning (6.1.) og methylerucatoopløsning (4.6.) På grund af belægningens skrøbelige natur er det nødvendigt at udvise særlig omhu under applikeringen af opløsningerne (NB: om ønsket kan der applikeres 50µl methylerucatoopløsning (4.6.) på pladen som ovenfor for at bidrage til identifikation af methylerucatabåndet efter fremkaldelsen). Efter applikeringen af methylestere kan man lade den nederste kant af pladen stå i diethylether, indtil etheren når ca. 5 mm op over det område, hvor prøven er applikeret. Dette vil koncentrere methylesternerne i et snævert bånd. NB: om ønsket kan der applikeres 50µl af methylerucatoopløsningen (4.6.) på pladen for at lette identifikationen af methylerucatabåndet efter fremkaldelsen (se fig. 1).

6.2.3. Udvikling af plader

Der hældes tilstrækkeligt med udviklingsvædske (4.8.) i tanken til at give en dybde på ca. 5 mm, hvorefter tanken med låg anbringes i en dybfryser (5.1.1.) ved minus 25°C eller så nær ved denne temperatur som muligt. Efter to timer anbringes pladen omhyggeligt i tanken, idet man lader opløsningen stige til mellem ca. halvdelen og to tredjedele af pladens højde. Derefter fjernes pladen, og opløsningen fordampes forsigtigt fra pladen med en strøm af nitrogen. Pladen anbringes på ny i tanken, hvor man lader opløsningsmidlet stige op til pladens top. Herefter fjernes pladen igen og tørres med en strøm af nitrogen ligesom før, hvorefter den sprøjtes med 2,7 dichlorofluoresceinopløsning (4.9.).

Set under ultraviolet lys kan methylerucat i prøven lokaliseres ved reference til det forstærkede bånd i prøven, hvortil methylerucat er blevet tilsat (se figur ...)

6.2.4. Adskillelse af methylesterfraktionerne

Det methylerucatabånd, der har udviklet sig fra prøven, skræbes af kvantitativt i et 50 ml bægerglas. Den silicagel over og under methylerucatabåndet, som indeholder alle de øvrige fraktioner af fedtsyremethylestere, afskræbes kvantitativt i et andet 50 ml bægerglas. Til hvert bægerglas tilsættes 1,0 ml methyltetracosanoat standardopløsning (4.7.) og 10 ml diethylether (4.1.). Der omrøres, og bægrenes indhold overføres hver for sig til søjlerne eller filtrerne (5.1.4.), som indeholder ca. 1 g silicagel (4.4.), og esterne udtrækkes ved hjælp af tre eller fire 10 ml portioner diethylether. Filtraterne opsamles i små kolber og inddampes til små rumfang under en svag nitrogenstrøm og overføres til små glasrør med tilspidset bund. Alt opløsningsmiddel fjernes ved fordampning under nitrogen på en sådan måde, at methylesternerne koncentrerer på bunden af rørene, hvorefter methylesternerne opløses i ca. 25-50µl hexan (4.2.)

6.3. Gas-væskechromatografi

6.3.1. Man benytter den fremgangsmåde der er beskrevet i afsnit III i bilag VI til Kommissionens forordning (EØF) nr. 72/77, og indsprøjter 1-2µl af de opløsninger af methylestere, der er fremkommet fra (i) den fraktion, der indeholder methylerucat, og (ii) de fraktioner, der indeholder resten af fedtsyremethylestere.

6.3.2. Fra den elektroniske integrator fås følgende top-arealer :

i) fra chromatogrammet for den fraktion, som indeholder methylerucat :

- a) methylerucat, [E];
- b) intern standard, [L₁];
- c) det totale areal af toppe for methylester med undtagelse af den interne standard [EF].

ii) fra chromatogrammet med fraktioner indeholdende resten af fedtsyremethylestere :

- a) det totale top-område med undtagelse af den interne standard, [RF];
- b) interne standard. [L₂].

7. ANGIVELSE AF RESULTATER

7.1. Beregningsmetode og formel

7.1.1. Prøvens indhold af erucasyre udtrykt som methylester i procent af den totale mængde af methylestere af fede syrer i prøven fås af udtrykket :

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

hvor

E, EF, RF, L₁ og L₂ er de under 6.3.2. omtalte top-områder, om nødvendigt korrigeret ved anvendelse af kalibreringsfaktorer.

Indholdet af methylerucat opnået ved ovenstående formel svarer til indholdet af erucasyre udtrykt i procent af det totale indhold fedtsyrer.

7.1.2. Hvis topområdernes areal er udtrykt i procent beregnes værdierne EF og RF på følgende måde :

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2.$$

7.1.3. Beregningsmetoden (7.1.1.) forudsætter, at mængden af tetraconsansyre i prøven er ubetydelig. Når en vis mængde af denne syre er til stede, kan mængden af tetraconsansyre (L₂) på kromatogrammet over fraktioner indeholdende de øvrige fedtsyremethylestere reduceres til :

$$L_2 - T_2$$

hvor

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

T₂ = Arealet af topområdet for tetraconsansyre methylestere stammende fra prøven, som udgør en del af det topområde, der er tilskrevet den interne standard på kromatogrammet over den resterende fraktion af fedtsyremethylester.

P₂ = Arealet af topområdet for palmitinsyre methylester på kromatogrammet over den resterende fraktion.

T₀ = Arealet af topområdet for tetraconsansyre methylester på kromatogrammet over det samlede antal fedtsyremethylester bestemt ved den analyse, der er gengivet i artikel 2 i direktivet.

P₀ = Arealet af topområdet for palmitinsyre methylester på kromatogrammet over det samlede antal fedtsyrer bestemt ved den analyse, der er gengivet i artikel 2 i direktivet.

7.1.4. *Udledning af formel*

Fedtsyreindholdet af den fraktion, der indeholder methylerucat, udtrykt som procentdel af prøvens samlede indhold af fede syrer, er givet ved udtrykket :

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

Indholdet af erucasyre i den fraktion, der indeholder methylerucat, udtrykt som procentdel af de fede syrer i metylerucatfraktionen, fås af udtrykket :

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

Herefter er prøvens indhold af erucasyre, udtrykt i procent af totalindholdet af fede syrer, givet ved :

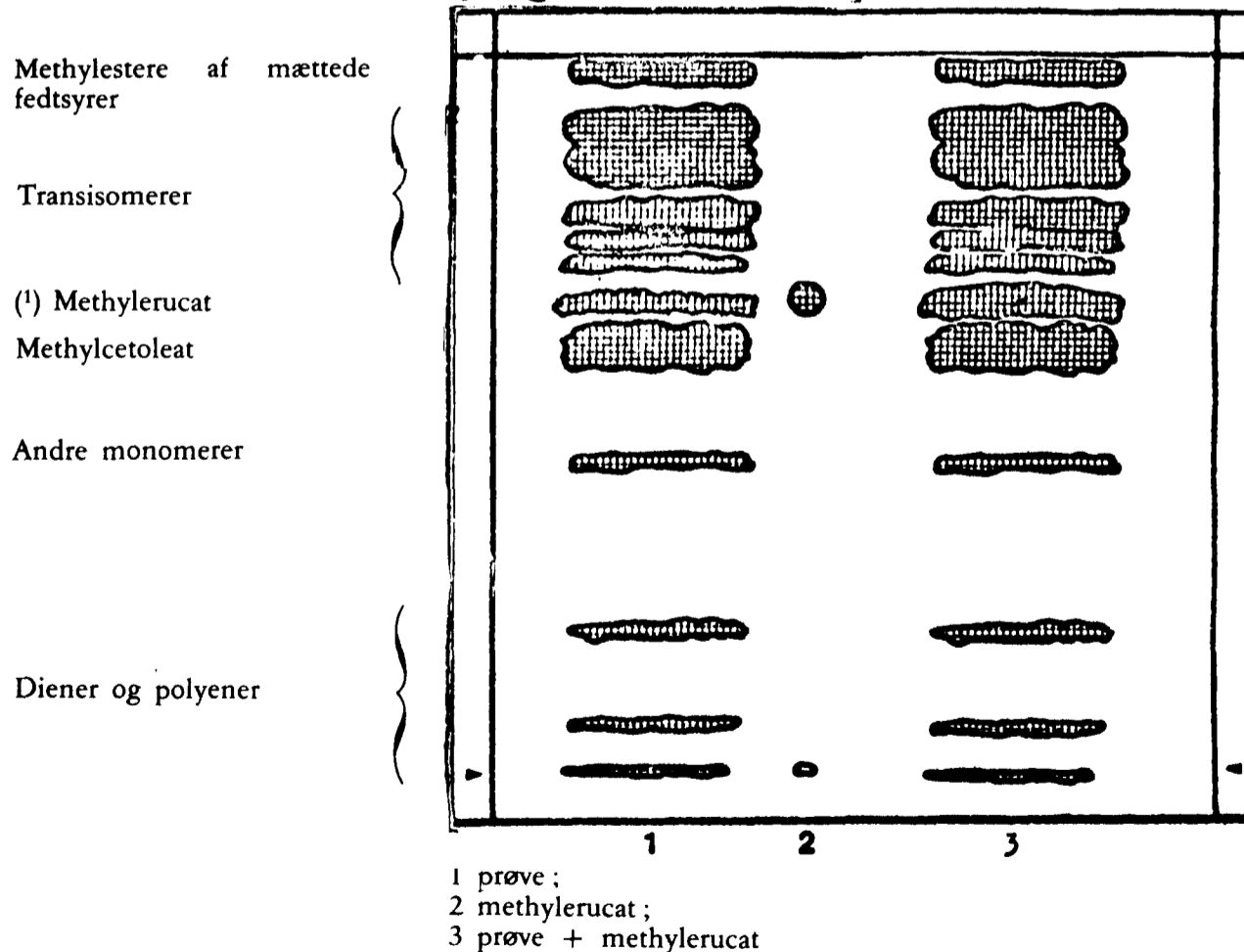
$$L_1 \frac{EF}{\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times \frac{E}{EF} \times 100 \quad \text{eller} \quad L_1 \frac{E}{\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times 100.$$

7.1.5. *Gentagelighed*

Forskellen mellem resultaterne af to parallelle bestemmelser udført på samme prøve under samme betingelser og af samme person må ikke overstige 10 % i relativ værdi eller 0,5 g pr. 100 g prøve i absolut værdi af den højeste af de bestemte værdier.

FIGUR

Standardtyndlagschromatografi visende adskillelsen af methylesterne af erucasyre af ceteleinsyre og trans-isomer af C₂₂-syre



(¹) Den fraktion, der er bestemt som methylerucat, vil normalt indeholde methylestere af andre monoensyrer, men skulle være fri for methylcetoleat.