

31980L0891

27.9.1980

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 254/35

DYREKTYWA KOMISJI

z dnia 25 lipca 1980 r.

odnosząca się do wspólnotowej metody analizy w celu określania zawartości kwasu erukowego w olejach i tłuszczach przeznaczonych do spożycia przez ludzi oraz w środkach spożywczych zawierających dodatek olejów lub tłuszczów

(80/891/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady 76/621/EWG z dnia 20 lipca 1976 r. w sprawie ustalenia najwyższego poziomu kwasu erukowego w olejach i tłuszczach przeznaczonych do spożycia przez ludzi oraz w środkach spożywczych zawierających dodatek olejów lub tłuszczów ⁽¹⁾, w szczególności jej art. 3,

a także mając na uwadze, co następuje:

artykuł 2 dyrektywy 76/621/EWG przewiduje, że od dnia 1 lipca 1979 r., zawartość kwasu erukowego produktów określonych w art. 1 niniejszej dyrektywy, obliczana na podstawie całkowitego poziomu zawartości kwasów tłuszczowych w składniku tłuszczu, nie może być większa niż 5 %;

artykuł 3 dyrektywy 76/621/EWG przewiduje, że zawartość kwasu erukowego jest ustalana z zastosowaniem wspólnotowej metody analizy;

rozporządzenie (EWG) nr 1470/68 z dnia 23 września 1968 r. w sprawie pobierania i redukcji próbek oraz określania zawartości oleju, zanieczyszczeń i wilgotności w nasionach oleistych ⁽²⁾, ustanawia w załączniku VI, wprowadzoną rozporządzeniem (EWG) nr 72/73 ⁽³⁾, metodę analizy określającą zawartość kwasu erukowego w nasionach rzepaku i rzepiku; metoda ta powinna być stosowana jako metoda odsiewania;

jest niemożliwe, podczas analizowania składu kwasów tłuszczowych olejów i tłuszczów z zastosowaniem chromatografii gazowo-cieczowej w warunkach normalnych, odróżnienie kwasu erukowego od innych izomerów kwasu dokozenowego, takich jak kwas cetoleinowy;

konieczne jest określenie poziomu kwasu erukowego w olejach i tłuszczach, tak jak i w środkach spożywczych, do których oleje lub tłuszcze są dodawane, i które mogą zawierać kwas cetoleinowy i inne izomery kwasu dokozenowego;

nie ma potrzeby ustalania poziomu kwasu erukowego w olejach i tłuszczach oraz w środkach spożywczych, do których

dodawane są oleje i tłuszcze w przypadku gdy po zastosowaniu analizy metod odsiewania wykazują one nie więcej niż 5 % całkowitej zawartości kwasów dokozenowych lub kwasów cis-dokozenowych;

do czasu wprowadzenia ulepszonej metody analizy określania zawartości kwasu erukowego, obecnie ta metoda analizy jest uważana jako najbardziej odpowiednia;

środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Środków Spożywczych,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Państwa Członkowskie wymagają, żeby analiza niezbędna do określenia zawartości kwasu erukowego wchodzącego w skład produktów określonych w art. 1 dyrektywy 76/621/EWG, była wykonywana, jak ustanowiono w art. 2.

Artykuł 2

1. Do celów odsiewania ustala się:

- a) całkowitą zawartość kwasu dokozenowego w produktach określonych w art. 1 z zastosowaniem metody wymienionej w załączniku VI do rozporządzenia (EWG) nr 1470/68; lub
- b) całkowitą zawartość kwasu cis-dokozenowego w produktach określonych w art. 1, z zastosowaniem metody wymienionej w załączniku VI do rozporządzenia (EWG) nr 1470/68, stosując chromatografię gazowo-cieczową w warunkach, w których izomery cis- i trans-kwasów dokozenowych są separowane; fazą stacjonarną odpowiednią w tym celu są na przykład cyjanopropyl-polisilozany lub ciekłe krysztale.

2. Jeśli całkowita zawartość:

- a) kwasów dokozenowych, ustalona zgodnie z ust. 1 lit. a), albo
- b) kwasów cis-dokozenowych, ustalona zgodnie z ust. 1 lit. b),

⁽¹⁾ Dz.U. L 202 z 28.7.1976, str. 35.

⁽²⁾ Dz.U. L 239 z 28.9.1968, str. 2.

⁽³⁾ Dz.U. L 12 z 15.1.1977, str. 11.

w produktach określonych w art. 1, obliczona na podstawie ich całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych w składniku tłuszczu, nie przekracza 5 %, dalsze określanie nie jest wymagane. W przeciwnym razie, zawartość kwasu erukowego ustala się z zastosowaniem metody wymienionej w załączniku do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 3

Nie później niż do dnia 1 lutego 1982 r. Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 25 lipca 1980 r.

W imieniu Komisji

Étienne DAVIGNON

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK

OKREŚLENIE ZAWARTOŚCI KWASU ERUKOWEGO W OLEJACH I TŁUSZCZACH PRZEZNACZONYCH DO SPOŻYCIA PRZEZ LUDZI ORAZ W OLEJOWYCH LUB TŁUSZCZOWYCH SKŁADNIKACH ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH DO, KTÓRYCH DODANO OLEJE I TŁUSZCZE**I. WPROWADZENIE****1. PRZYGOTOWANIE PRÓBK****1.1. Uwagi ogólne**

Masa próbki przedłożonej do laboratorium celem analizy wynosi zwykle 50 g, chyba że wymagana jest większa ilość.

1.2. Przygotowanie próbki do analizy w laboratorium

Próbka musi być ujednoliconą przed jej analizą.

1.3. Pojemniki

Tak przygotowana próbka musi być przechowywana w hermetycznym, nieprzepuszczającym powietrza i niewchłaniającym wilgoci pojemniku.

2. ODCZYNNIKI**2.1. Woda**

2.1.1. W przypadku gdy woda wymagana jest jako rozpuszczalnik, rozcieńczalnik lub do przemywania, należy użyć wody destylowanej lub demineralizowanej, o co najmniej równoważnej czystości.

2.1.2. W przypadku, gdy jest mowa o „roztworze” lub „roztworze” bez określenia jakiegokolwiek innego odczynnika, oznacza to roztwór wody lub roztwór wodny.

2.2. Chemikalia

Wszystkie stosowane chemikalia powinny być uznanej czystości analitycznej, chyba że określono inaczej.

3. APARATURA**3.1. Wykaz aparatury**

Niniejszy wykaz zawiera tylko pozycje specjalistyczne wraz ze specyfikacją.

3.2. Waga analityczna

„Waga analityczna” oznacza wagę o dokładności 0,1 miligrama lub większej.

4. WYRAŻENIE WYNIKÓW**4.1. Wyniki**

Wynik określony w sprawozdaniu z urzędowej analizy jest wartością średnią, uzyskaną z nie mniej niż dwóch oznaczeń, których powtarzalność jest zadowalająca.

4.2. Obliczenie wartości procentowej

Jeśli nie ustalono inaczej, wyniki wyraża się jako masowa zawartość procentowa (m/m) całkowitej ilości kwasów tłuszczowych w próbce, jak uzyskano laboratoryjnie.

4.3. Liczba znaczących cyfr

Liczba znaczących cyfr wyniku tak wyrażonego jest zależna od dokładności metody.

II. OKREŚLENIE KWASU ERUKOWEGO

1. PRZEDMIOT I ZAKRES ZASTOSOWANIA

Metoda określa zawartość kwasu erukowego w:

- i) olejach i tłuszczach zawierających kwas cetoleinowy (w szczególności *cis*-izomeru kwasu dokozenowego występującego w olejach rybnych); i
- ii) uwodornionych olejach i tłuszczach zawierających *trans*- i *cis*- izomery kwasu dokozenowego.

2. DEFINICJA

Zawartość kwasu erukowego: zawartość kwasu erukowego jaką ustalono określoną metodą.

3. ZASADA

Estry metylowe składowych kwasów tłuszczowych olejów lub tłuszczów są rozdzielane poprzez niskotemperaturową argentację produktów z chromatografii cienkowarstwowej i ilościowe oznaczenie za pomocą chromatografii gazowo-cieczowej.

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. Eter dwuetylowy, wolny od nadtlenu, świeżo destylowany.
- 4.2. n-heksan.
- 4.3. Żel krzemionkowy G, dla chromatografii cienkowarstwowej.
- 4.4. Żel krzemionkowy, dla chromatografii kolumnowej.
- 4.5. Roztwór azotanu srebra, 200 g/litr. Rozpuścić 24 g azotanu srebra w wodzie i dopełnić wodą do objętości 120 ml.
- 4.6. Roztwór erukanu metylowego 5 mg/ml. Rozpuścić 50 mg erukanu metylowego w kilku mililitrach n-heksanu i rozcieńczyć do 10 ml n-heksanem.
- 4.7. Metylowy tetrakozenian jako wewnętrzny roztwór mianowany 0 725 mg/ml. Rozpuścić 25 miligram metylowego tetrakozenianu w kilku mililitrach n-heksanu (jak 4.6) i rozcieńczyć do 100ml n-heksanem.
- 4.8. Rozpuszczalnik rozwijający toluene/n-heksan w stosunku objętościowym 90:10 (v/v).
- 4.9. Roztwór 2,7-dwuchlorofluoresceiny 0,5 grama/litr. Rozpuścić ogrzewając i mieszając 50 miligramów 2,7-dwuchlorofluoresceiny w 100ml w 50 % roztworze wodnym metanolu..

5. APARATURA

- 5.1. Aparatura do chromatografii cienkowarstwowej, włączając w szczególności:
 - 5.1.1. Zamrażarkę, zdolną do utrzymywania zbiornika wywołującego wraz z zawartością w temperaturze od minus 20 do minus 25 °C.
 - 5.1.2. Płytki szklane, 200 × 200 mm.
 - 5.1.3. Lampa ultrafioletowa.
 - 5.1.4. Kolumny szklane, długości około 200 mm, o średnicy wewnętrznej około 10 mm z filtrem z waty szklanej lub szkła spiekanego. Do wyboru, małe lejki z filtrem ze szkła spiekanego.
 - 5.1.5. Aplikator do nakładania roztworów w postaci wąskiego pasma lub smugi na płytki do chromatografii cienkowarstwowej TLC.
- 5.2. Chromatograf cieczowo-gazowy wraz z integratorem elektronicznym, jak określono w załączniku VI sekcja III do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 72/77.

6. PROCEDURA

6.1. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Wziąć około 400 mg oleju lub tłuszczu tworzącego próbkę do analizy i przygotować roztwór zawierający około 20-50 mg/ml estrów metylowych kwasu tłuszczowego w n-heksanie, metodą określoną w załączniku VI sekcja II.3 do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 72/77.

6.2. Chromatografia cienkowarstwowa

6.2.1. Przygotowanie płytek

Umieścić 60 g żelu krzemionkowego (pkt 4.3) w 500 ml kolbie okrągłodennej, dodać 120 ml roztworu azotanu srebra (pkt 4.5) i wytrząsać przez jedną minutę do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Nanieść zawiesinę w zwykły sposób na płytki; grubość warstwy musi być około 0,75 mm. Ilość zawiesiny jest wystarczająca dla przygotowania pięciu płytek 200 × 200 mm.

Pozwolić płytkom podeschnąć częściowo na powietrzu (zalecane jest pozostawienie ich w ciemności na około 30 minut). Wysuszyć całkowicie płytki i aktywować je, poprzez umieszczenie ich w suszarce, utrzymując temperaturę 100 °C przez dwie godziny i trzydzieści minut. Użyć płytki tak szybko, jak to możliwe po aktywacji lub starannie przechowywać w ciemnej szafce, a następnie reaktywować przed użyciem. (Uwaga: aktywacja w 110 °C przez jedną godzinę jest wystarczająca do zapobieżenia nieciemnieniu płytek). Przed użyciem naciąć linie poprzez pokrycie, 10 mm od brzegów i góry każdej płytki dla zmniejszenia efektu krawędziowego w czasie rozwijania.

6.2.2. Nałożenie estrów metylowych

Używając aplikator (pkt 5.1.5) nanieść 50 mikrolitrów roztworu estrów metylowych (pkt 6.1) przygotowanego z próbki, w postaci wąskiej smugi około 50mm długości, przynajmniej 40 mm od brzegu płytki i 10 mm od dołu. Nanieść w podobny sposób 100 mikrolitrów roztworu zawierającego równe objętości przygotowanego roztworu estrów metylowych (pkt 6.1) i roztwór erukanu metylowego (pkt 4.6). Zachować szczególną ostrożność w trakcie nakładania roztworów z powodu kruchości pokrycia (Uwaga: jeśli niezbędne, nanieść 50 mikrolitrów roztworu erukanu metylowego (pkt 4.6) na płytkę, dla udziału w identyfikacji wstęgi erukanu metylowego po rozwinięciu: patrz rysunek). Po naniesieniu estrów metylowych wstawić dolną krawędź płytki do eteru dwuetylowego, do momentu, gdy eter wchłonie się około 5 mm powyżej powierzchni naniesionej próbki. Niniejszy zabieg zatęży estry metylowe w wąskie pasmo.

6.2.3. Rozwijanie płytek

Nalać rozpuszczalnika rozwijającego (pkt 4.8) do zbiornika na głębokość 5 mm i umieścić zbiornik, zaopatrzony w pokrywę, w zamrażarce (pkt 5.1.1) ustawionej na minus 25 °C, lub tak blisko tej temperatury, jak to możliwe. (W niektórych przypadkach jest korzystne wypoziomować zbiornik). Po dwóch godzinach umieścić ostrożnie płytkę w zbiorniku i pozwolić rozpuszczalnikowi wchłonąć się do połowy lub dwóch trzecich wysokości płytki. Wyjąć płytkę i delikatnie odparować rozpuszczalnik strumieniem azotu. Umieścić ponownie płytkę w zbiorniku i pozwolić rozpuszczalnikowi wznieść się do wierzchołka płytki. Wyjąć płytkę i jak uprzednio wysuszyć w strumieniu azotu, a następnie rozpylić na nią ostrożnie roztwór 2,7-dwuchlorofluorosceiny (pkt 4.9).

Obejrzyć płytkę w świetle ultrafioletowym i zlokalizować pasmo zawierające erukan metylowy w próbce, przez odniesienie go do intensywnego pasma w próbce, do której dodano erukan metylowy (patrz: rysunek).

6.2.4. Oddzielanie frakcji estru metylowego

Zeskrobać pasmo erukanu metylowego pochodzącego z próbki do 50 ml zlewki, zachowując ostrożność, by zapobiec stratom. W podobny sposób przenieść żel krzemionkowy znajdujący się powyżej i poniżej pasma erukanu metylowego do innej 50 ml zlewki. Niniejsze pasmo zawiera wszystkie inne frakcje estrów metylowych kwasu tłuszczowego. Dodać 1,0 ml roztworu wzorcowego tetrakozenianu metylu (pkt 4.7) i 10 ml eteru dwuetylowego (pkt 4.1) do każdej zlewki. Wymieszać i przenieść zawartość zlewek do oddzielnych kolumn lub lejków (pkt 5.1.4), z których każdy zawiera około 1 g żelu krzemionkowego (pkt 4.4); wymyć estry metylowe, używając trzy lub cztery porcje po 10 ml eteru dwuetylowego. Zebrać filtry w małe kolby. Odparować każdy filtrat do małej objętości stosując delikatny strumień azotu i przenieść estry metylowe do małych probówek szklanych o zaokrąglonych dnach. Usunąć cały rozpuszczalnik poprzez odparowanie strumieniem azotu, w taki sposób, by estry metylowe zebrały się na dnie probówek. Rozpuścić estry metylowe w około 25–50 mikrolitrów n-heksanu (pkt 4.2).

6.3 Chromatografia gazowo-cieczowa

6.3.1. Przeprowadzić procedurę opisaną w załączniku VI sekcja III do rozporządzenia Komisji 72/77/EWG i zanalizować 1–2 mikrolitrów roztworów estru metylowego uzyskanego z i) frakcji zawierającej erukan metylowy; i ii) frakcji zawierających pozostałość metylowanych kwasów tłuszczowych.

6.3.2. Przy pomocy elektronicznego integratora uzyskać następujące powierzchnie pików:

- i) z chromatogramu frakcji zawierającej erukan metylowy:
 - a) erukanu metylu [E]
 - b) wzorca wewnętrznego [L_1]
 - c) całkowite powierzchnie estru metylowego, wyłączając wzorzec wewnętrzny [EF]
- ii) z chromatogramu frakcji zawierających pozostałość estrów metylowych kwasu tłuszczowego
 - a) całkowite powierzchnie pików estru metylowego, wyłączając wzorzec wewnętrzny [RF]
 - b) wzorzec wewnętrzny [L_2]

7. WYRAŻENIE WYNIKÓW

7.1. Metoda obliczenia i wzór

7.1.1. Zawartość kwasu erukowego w próbce, wyrażoną w warunkach jego estru metylowego jako zawartość procentowa całkowitej ilości estrów metylu kwasu tłuszczowego przygotowanych z próbki, określa się przez:

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

gdzie:

E, EF, RF, L_1 i L_2 są powierzchniami pików, określonymi w pkt 6.3.2, skorygowane, jeśli konieczne poprzez użycie współczynników kalibracji.

Do celów praktycznych wartość erukanu metylu, określona powyższym wzorem, jest równoważna poziomowi kwasu erukowego, wyrażonemu jako zawartość procentowa całkowitego poziomu kwasów tłuszczowych w próbce.

7.1.2. Jeżeli powierzchnie pików są uzyskiwane jako procentowe, wartości EF i RF oblicza się jak następuje:

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2$$

7.1.3. Metoda obliczania (pkt 7.1.1) zakłada, że poziom kwasu tetrakozenowego w próbce jest nieznaczny. Jeśli znaczące ilości niniejszego kwasu okazują się być obecne, wartość dla kwasu tetrakozenowego (L_2) uzyskana z chromatogramu frakcji zawierających pozostałość estrów metylowych kwasu tłuszczowego, musi być zmniejszona do:

$$L_2 - T_2$$

gdzie:

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

oraz

T_2 = powierzchnia pików tetrakozenianu metylowego pochodząca z próbki i która tworzy część powierzchni pików przypisanej wzorcowi wewnętrznemu w chromatogramie frakcji pozostałości estrów metylowych kwasu tłuszczowego

P_2 = powierzchnia pików palmitynianu metylowego uzyskanego z chromatogramu frakcji pozostałości

T_0 = powierzchnia pików tetrakozenianu metylowego uzyskana z chromatogramu estrów metylowych całkowitej ilości kwasów tłuszczowych oznaczona analizą podaną w art. 2 niniejszej dyrektywy

P_0 = powierzchnia pików palmitynianu metylowego uzyskana z chromatogramu estrów metylowych całkowitej ilości kwasów tłuszczowych, oznaczonej poprzez analizę podaną w art. 2 niniejszej dyrektywy.

7.1.4. Wyprowadzenie wzoru

Proporcja kwasów tłuszczowych w frakcji zawierającej erukan metylowy, wyrażona jako zawartość procentowa całkowitej ilości kwasów tłuszczowych w próbce określona jest przez:

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

Proporcja kwasu erukowego w frakcji zawierającej erukan metylowy jest określona przez:

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

Stąd zawartość kwasu erukowego w próbce wyrażona jako zawartość procentowa całkowitej ilości kwasów tłuszczowych, jest określona przez:

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

7.1.5. Powtarzalność

Różnica między wartościami dwóch oznaczeń, przeprowadzonych równocześnie lub szybko następujących po sobie, na tej samej próbce, przez tego samego analityka, w tych samych warunkach, nie może przekraczać 10 % wyniku lub 0,5 gram na 100 gram próbki, biorąc większą wartość.

RYSUNEK

Typowy cienkowarstwowy chromatogram ukazujący rozdział estrów metylowych kwasu erukowego, cetolei nowego kwasu i trans-izomerów kwasu dokozenowego

Nasycone estry metylowe kwasu
tłuszczowego

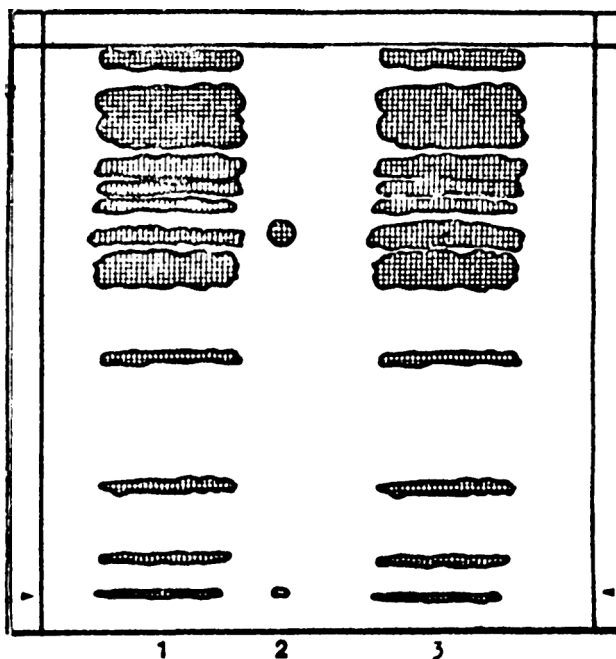
trans-izomery

metylowy erukan ⁽¹⁾

metylowy cetoleinian

inne monoeny

dieny i polieny



1 próbka
2 metylowy erukan
3 próbka + metylowy erukan

⁽¹⁾ Frakcja określana jako erukan metylowy zwykle zawiera estery metylowe innych monoenoicznych kwasów, lecz musi być wolna od cetoleinianu metylowego.