380L0891

27. 9. 80 Diario Oficial de las Comunidades Europeas Nº L 254/35

DIRECTIVA DE LA COMISIÓN

de 25 de julio de 1980

relativa a la método de análisis comunitario para la determinación del contenido en ácido en los aceites y grasas destinados como tales a la alimentación humana, y en los productos alimenticios que contengan aceites o grasas añadidas

(80/891/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 76/621/CEE del Consejo, de 20 de julio de 1976, relativa a la fijación del nivel máximo de ácido erúcico en los aceites y grasas destinados como tales a la alimentación humana, y en los productos alimenticios que contengan aceites o grasas añadidas (1) y, en particular, su artículo 3,

Considerando que el artículo 2 de la Directiva 76/621/CEE establece que, a partir del 1º de julio de 1979, el contenido en ácido erúcico de los productos a que se refiere al artículo 1 de la Directiva citada, calculado sobre su contenido total de ácidos grasos en la fase grasa, no podrá ser superior al 5%;

Considerando que el artículo 3 de la Directiva 76/721/CEE establece que el contenido en ácido erúcico debe ser controlado por un método de análisis comunitario;

Considerando que el Reglamento (CEE) nº 1470/68 de la Comisión, de 23 de septiembre de 1968, relativo a la toma y reducción de muestras a la determinación de la proporción de aceite, de impurezas y de humedad de los granos oleaginosos (2), contempla en su Anexo VI, establecido por el Reglamento (CEE) nº 72/77 (3), un método de análisis para la determinación del contenido ácido erúcico en los granos de colza y de nabina; que conviene utilizar dicho método como método de preselección;

Considerando que en las condiciones normales de análisis de los aceites y grasas por cromatografía de gases de los ácidos grasos que entren en su composición, no es posible distinguir entre el ácido erúcico y otros isomeros del ácido docosenoico, como el ácido cetoleico;

Considerando que es necesario determinar los niveles de ácido erúcico en los aceites, las grasas y los productos alimenticios a los que se hayan añadido aceites o grasas que puedan contener ácido cetoleico, y otros isomeros del ácido docosenoico;

Considerando que no es preciso determinar el nivel de ácido erúcico en los aceites, las grasas y los productos alimenticios a los que se haya añadido aceites o grasas cuyo análisis preliminar revele que la proporción total de ácidos docosenoicos o de ácidos cisdocosenoicos no es superior al 5%;

Considerando que, en espera de la introducción de un método más exacto de análisis para la determinación del ácido erúcico, el presente método de análisis se considera de momento como el más apropiado;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se atienen al dictamen del Comité permanente de productos alimenticios,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros exigirán que los análisis necesarios para la determinación del contenido en ácido erúcico de los productos mencionados en el artículo 1 de la Directiva 76/621/CEE se efectúen de conformidad con el artículo 2.

Artículo 2

1. Deberán determinarse, a título de preselección:

a) el contenido total en ácidos grasos docosenoicos de los productos mencionados en el artículo 1 por el método descrito en el Anexo VI del Regolamento (CEE) nº 1470/68;

b) el contenido total en ácidos grasos cis-docosenoicos de los productos mencionados en el artículo 1 por el método descrito en el Anexo VI del Reglamento (CEE) nº 1470/68, utilizando la cromatografía de gases en tales condiciones que los isomeros cis y trans de los ácidos docosenoicos sean separados; fases estacionarias adecuadas para ello serán por ejemplo el «cianopropil-polisiloxano» o los cristales líquidos.

2. Si el contenido total:

a) en ácidos grasos docosenoicos, determinado con arreglo a la letra a) del apartado 1, o

b) en ácidos grasos cis-docosenoicos, determinado con arreglo a la letra b) del apartado 1

(1) DO nº L 202 de 28. 7. 1976, p. 35.
(2) DO nº L 239 de 28. 9. 1968, p. 2.
(3) DO nº L 12 de 15. 1. 1977, p. 11.

de los productos mencionados en el artículo 1, calculado sobre su contenido total de ácidos grasos en la fase grasa, no fuera superior al 5 %, no se exigirá ninguna otra determinación: En caso contrario, el contenido en ácido erúcico se determinará por el método descrito en el Anexo de la presente Directiva.

Artículo 3

Los Estados miembros aplicarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir a la presente Directiva a más tardar el 1 de febrero de 1982, e informarán inmediatamente de ello a la Comisión.

Artículo 4

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 25 de julio de 1980.

Por la Comisión

Étienne DAVIGNON

Miembro de la Comisión

ANEXO

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ÁCIDO ERÚCICO EN LOS ACEITES Y GRASAS DESTINADAS COMO TALES A LA ALIMENTACIÓN HUMANA, Y EN LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS QUE CONTENGAN ACEITES O GRASAS AÑADIDAS

I. INTRODUCCIÓN

1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1.1. **Generalidades**

El peso de la muestra presentada al laboratorio para su análisis deberá ser normalmente de 50 g, a menos que sea necesario una cantidad mayor.

1.2. **Preparación de la muestra**

La muestra deberá ser homogeneizada antes del análisis.

1.3. **Conservación**

La muestra así preparada deberá conservarse siempre en un recipiente hermético.

2. REACTIVOS

2.1. **Agua**

2.1.1. Cuando se haga mención al agua para soluciones, disoluciones y lavados, se tratará siempre de agua destilada o de agua desmineralizada de pureza equivalente.

2.1.2. Cuando se haga mención a una «solución» o una «disolución», sin indicación de otros reactivos, se tratará de una solución o disolución acuosa.

2.2. **Productos químicos**

Todos los reactivos deberán ser de calidad analítica, salvo disposición en contrario.

3. EQUIPO

3.1. **Lista de apartos**

En la lista de material se incluirán únicamente aquellos aparatos de uso especializado y con especificaciones particulares.

3.2. **Balanza analítica**

Por balanza analítica se entenderá una balanza con una precisión mínima de 0,1 mg.

4. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. **Resultados**

El resultado que se indicará en el informe del análisis será el valor medio obtenido, como mínimo, a partir de dos determinaciones cuya repetibilidad sea satisfactoria.

4.2. **Cálculo del porcentaje**

Salvo disposición especial, los resultados se expresarán en porcentaje (m/m) de los ácidos grasos totales en la muestra en el estado en que ésta hubiese llegado al laboratorio.

4.3. **Número de cifras significativas**

El resultado no deberá incluir más cifras significativas de las que permita la precisión del método.

II. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO ERÚCICO

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN DE MÉTODO

El método permitirá determinar el contenido en ácido erúcico de:

a) los aceites y las grasas que contengan ácido cetoleico (un isómero cis del ácido docosenoico que se encuentra en los aceites de pescado)

b) los aceites y las grasas hidrogenadas que contengan isómeros cis y trans del ácido docosenoico.

2. DEFINICIÓN

Contenido en ácido erúcico: el contenido en ácido erúcico determinado por el método indicado a continuación.

3. PRINCIPIO

Separación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por cromatografía a baja temperatura sobre capa fina tratada con nitrato de plata y determinación cuantitativa de los ésteres así separados por cromatografía de gases.

4. REACTIVOS

4.1. Ester dietílico recién destilado, sin peróxido.

4.2. n-Hexano.

4.3. Gel de sílice G, para cromatografía sobre capa fina.

4.4. Gel de sílice para cromatografía sobre columna.

4.5. Solución de nitrato de plata a 200 g/l. Disolver 24 g de nitrato de plata en agua y llevar el volumen a 120 ml con agua.

4.6. Solución de erucato de metilo a 5 mg/ml. Disolver 50 mg de erucato de metilo en algunos ml de n-Hexano y llevar el volumen a 10 ml con n-Hexano.

4.7. Solución patrón interno de tetracosaonato de metilo a 0,25 mg/ml. Disolver 25 mg de tetracosaonato de metilo en algunos ml de n-Hexano (como en el número 4.6) y llevar el volumen a 100 ml con n-Hexano.

4.8. Disolvente de desarrollo: tolueno y n-Hexano en la proporción 90 a 10 (v/v).

4.9. Solución de 2,7 diclorofluoresceno a 0,5 g/1. Disolver calentando y agitando 50 mg de 2,7 diclorofluoresceno en 100 ml de una solución acuosa que contenga un 50% de metanol.

5. EQUIPO

5.1. Aparato de cromatografía sobre capa fina que incluya en particular:

5.1.1. una unidad de congelación capaz de mantener la cubeta de desarrollo y su contenido a una temperatura entre − 20 ° − 25 °C;

5.1.2. placas de vidrio de 200 mm × 200 mm;

5.1.3. una lámpara de rayos ultravioleta;

5.1.4. columnas de vidrio de 200 mm de largo y cuyo diámetro interior sea de 10 mm, provistas de filtros de lana de vidrio o de vidrio calcinado, o bien pequeños embudos provistos de filtros de vidrio calcinado;

5.1.5. un aplicador para depositar las soluciones en forma de banda estrecha o de línea sobre placas TLC.

5.2. Aparato de cromatografía de gases acoplado a un integrador electrónico, tal como se describe en la Sección III del Anexo VI del Reglamento (CEE) n° 72/77.

6. MODO DE OPERAR

6.1. **Preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos**

Tomar una muestra de unos 400 mg de la grasa o del aceite que deba analizarse y preparar una solución que contenga entre 20 y 50 mg/ml de ésteres metílicos de ácidos grasos en n-Hexano, siguiendo el método expuesto en el número 3 de la Sección II del Anexo del Reglamento (CEE) n° 72/77.

6.2. **Cromatografía sobre capa fina**

6.2.1. *Preparación de las placas*

Colocar 60 g de gel de sílice (número 4.3) en un matraz con fondo redondo de una capacidad de 50 ml. Añadir 120 ml de solución de nitrato de plata (número 4.5) y agitar durante un minuto para obtener una pasta completamente homogénea. Extender ésta de la manera habitual sobre las placas y ajustar el espesor de la capa a 0,5 mm. Dicha cantidad de pasta será suficiente para la preparación de 5 placas de 200 mm × 200 mm. Secar parcialmente las placas al aire (preferentemente en la obscuridad durante 30 minutos) y a continuación secarlas completamente y activarlas en un horno a 100 °C durante 2h 30. Las placas deberán utilizarse en cuanto sea posible tras la fase de activación, o bien guardarse cuidadosamente en un armario al abrigo de la luz y reactivándolas antes de volverlas a utilizar. Antes de hacer uso de ellas, trazar surcos a través del substrato a 10 mm de los lados y de la parte superior de cada placa, a fin de disminuir los efectos marginales durante el desarrollo. *Nota:* la activación a 110 °C durante 1 hora podrá resultar satisfactoria a condición de que las placas no estén ennegrecidas.

6.2.2. *Aplicación de los ésteres metílicos*

Con ayuda del aplicador (número 5.1.5), depositar 50 µl de la solución de ésteres metílicos preparada a partir de la muestra que deba analizarse (número 6.1) sobre una fina línea de unos 50 mm de largo, a 40 mm como mínimo de los lados y a 10 mm de la parte inferior de la placa. Aplicar de la misma manera 100 ul de una solución que contenga volúmenes iguales de la solución de ésteres metílicos (número 6.1) y de la solución de erucato de metilo (número 4.6). La aplicación de las soluciones exigirá un particular cuidado dada la fragilidad del substrato. Tras la aplicación de los ésteres metílicos, colocar la parte inferior de la placa en el éter dietílico hasta que este último suba a unos 5 mm por encima de la zona de aplicación de la muestra que deba analizarse. Dicha operación concentrará los ésteres metílicos en una estrecha banda. *Nota:* Si se deseara, podrán aplicarse sobre la placa, 50 µl de solución de erucato de metilo (número 4.6) a fin de ayudar a la identificación de la banda de erucato de metilo tras desarrollo (ver figura).

6.2.3. *Desarrollo de las placas*

Verter una cantidad suficiente de disolvente (número 4.8) en la cubeta hasta alcanzar una profundidad de unos 5 mm y colocar la cubeta provista de su tapadera en un congelador (número 5.1.1) mantenido aproximadamente a − 25 °C (en determinados casos, podrá resultar útil proteger las paredes de la cubeta con algún tipo de revestimiento). Transcurridas 2 horas, colocar la placa en la cubeta con precaución y dejar subir el disolvente hasta que alcance una zona situada entre la mitad y los dos tercios de la altura de la placa. Retirar entonces la placa y evaporar lentamente el disolvente con ayuda de una corriente de nitrógeno. Volver a colocar la placa en la cubeta y dejar que el disolvente alcance la parte superior de la placa. Retirar la placa y secarla de nuevo con la corriente de nitrógeno, vaporizándola a continuación con la solución de 2,7 diclorofluoresceno (número 4.9).

En el examen con luz ultravioleta se podrá localizar la banda de erucato de metilo presente en la muestra por referencia a la banda más intensa de la muestra a la que se haya añadido el erucato de metilo (ver figura).

6.2.4. *Separación de las fracciones de ésteres metílicos*

Raspar cuantitativamente la banda de erucato de metilo procedente de la muestra en un recipiente de una capacidad de 50 ml. En otro recipiente de 50 ml, raspar cuantitativamente el gel de sílice que se encuentre encima y debajo de la banda de erucato de metilo y que contenga las demás fracciones de ésteres metílicos de ácidos grasos. En cada uno de los dos recipientes verter 1,0 ml de la solución patrón de tetracosaonato de metilo (número 4.7) y 10 ml de éter dietílico (número 4.1). Agitar y transferir separadamente el contenido de los recipientes a las correspondientes columnas o embudos (número 5.1.4) que contendrán aproximadamente 1 g de gel de sílice (número 4.4). A continuación, extraer tres o cuatro veces los ésteres con ayuda de 10 ml de éter dietílico. Recoger el producto de la filtración en pequeños matraces. Tras haber evaporado una parte del disolvente con una débil corriente de nitrógeno, transferir los ésteres metílicos a tubitos de vidrio con fondo puntiagudo. Evaporar el resto del disolvente con nitrógeno de manera que los ésteres metílicos se concentren en el fondo de los tubos. Disolver los ésteres metílicos en 25 a 50 µl de hexano (número 4.2).

6.3. **Cromatografía de gases**

6.3.1. Seguir el modo de operar descrito en la Sección III del Anexo VI del Reglamento (CEE) nº 72/77 e inyectar de 1 a 2 µl de las soluciones de ésteres metílicos obtenidos a partir (i) de la fracción que contenga el erucato de metilo y (ii) de las fracciones que contengan el resto de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

6.3.2. Las superficies de picos proporcionados por el integrador electrónico serán las siguientes:

i) a partir del cromatograma de la fracción que contenga el erucato de metilo:

a) erucato de metilo [E]

b) patrón interno [L_1]

c) superficies totales de los picos de los ésteres metílicos con excepción del patrón interno [EF];

ii) a partir del cromatograma de la fracción que contenga el resto de los ésteres metílicos de ácidos grasos:

a) superficies totales de los picos, con excepción del patrón interno [RF]

b) patrón interno [L_2].

7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1. Método de cálculo y fórmula

7.1.1. El contenido de ácido erúcico de la muestra, expresado como éster metílico en porcentaje de la proporción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales de la muestra, vendrá dado por la fórmula:

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

donde

E, EF, RF, L_1 y L_2 son las superficies de picos definidas en el número 6.3.2., corregidas si fuera necesario con ayuda de factores de calibración. El contenido de erucato de metilo obtenido por la fórmula anterior es equivalente al nivel de ácido erúcico expresado en porcentaje del contenido total de ácidos grasos.

7.1.2. Si la superficie de los picos fuera expresada en porcentaje, calcular como sigue los valores EF y RF:

$EF = 100 - L_1$

$RF = 100 - L_2$

7.1.3. El sistema de cálculo (número 7.1.1) supone que el nivel de ácido tetracosanoico en la muestra es despreciable. En presencia de cantidades importantes de dicho ácido, el valor en ácido tetracosanoico (L_2) obtenido por el cromatograma de las fracciones que contengan los demás ésteres metílicos de ácidos grasos deberá reducirse a:

$L_2 - T_2$

donde

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

T_2 = la superficie del pico del éster metílico del ácido tetracosanoico procedente de la muestra y que forma parte de la superficie de pico imputada al patrón interno en el cromatograma de la fracción restante de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

P_2 = la superficie de pico del éster metílico del ácido palmítico obtenida del cromatograma de la fracción restante,

T_0 = la superficie de pico del éster metílico de ácido tetracosanoico obtenida del cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales determinado por el análisis al que hace referencia el artículo 2 de la presente Directiva,

P_0 = la superficie de pico del éster metílico del ácido palmítico obtenido del cromatograma de los ésteres metílicos los ácidos grasos totales determinado por el análisis al que hace referencia el artículo 2 de la presente Directiva.

7.1.4. *Origen de la fórmula*

El contenido en ácido graso de la fracción que contenga el erucato de metilo, expresada en porcentaje del contenido total de ácidos grasos en la muestra, vendrá dada por:

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

El contenido en ácido erúcico de la fracción que contenga el erucato de metilo vendrá dada por:

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

De donde resulta que el contenido de ácido erúcico en la muestra, expresado en porcentaje del contenido total de ácido graso, vendrá dada por:

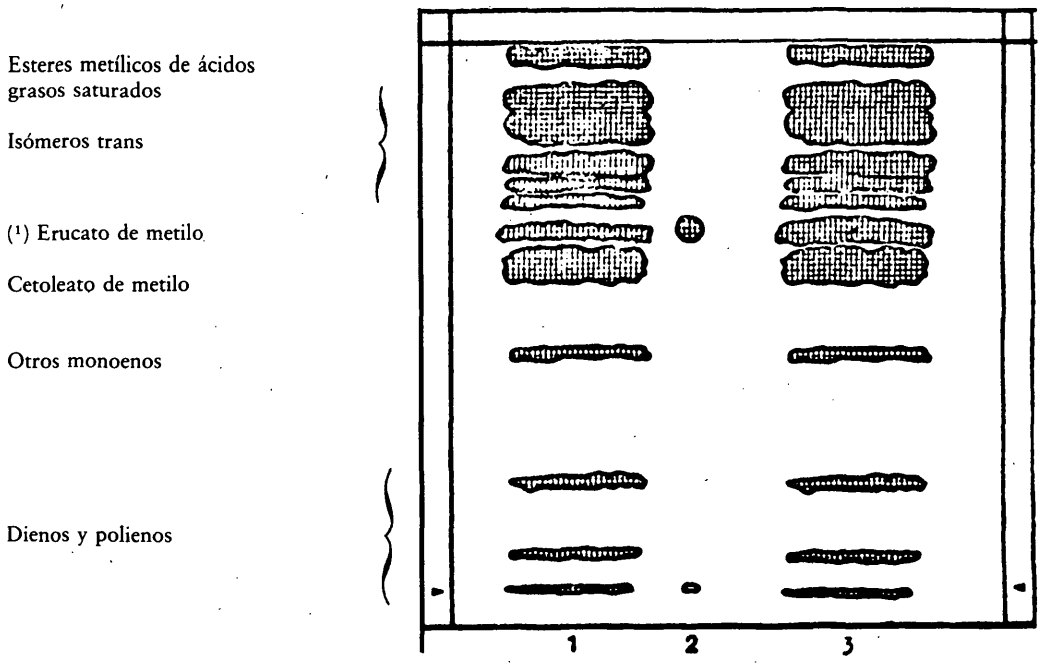
$$\frac{EF}{L_1\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times \frac{E}{EF} \times 100 \quad o \quad \frac{E}{L_1\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times 100$$

7.1.5. *Repetibilidad*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas simultáneamente en las mismas condiciones por el mismo analista sobre la misma muestra no deberá superar, en valor relativo, el 10% del resultado obtenido y, en valor absoluto, 0,5 g por 100 g de muestra, tomando el valor más elevado.

FIGURA

Típico ejemplo de cromatograma sobre capa delgada que muestra la separación de los ésteres metílicos del ácido erúcico, del ácido cetoleico y de los isomeros trans del ácido docosenoico



1. muestra,
2. erucato de metilo,
3. muestra + erucato de metilo.

(1) La fracción indicada como erucato de metilo contendrá normalmente ésteres metílicos de otros ácidos monoenoicos, pero deberá estar exenta de cetoleato de metilo.