31980L0891

27.9.1980 *EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA* L 254/35

# KOMISJONI DIREKTIIV,

## 25. juuli 1980,

## mis käsitleb ühenduses kehtivat analüüsimetoodikat eruukhappesisalduse määramiseks toiduõlides ja -rasvades ning õli- või rasvalisandiga toiduainetes

(80/891/EMÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 20. juuli 1976. aasta direktiivi 76/621/EMÜ, millega kinnitatakse maksimaalne eruukhappesisalduse tase toiduõlides ja -rasvades ning õli- või rasvalisandiga toiduainetes, ([1]) eriti selle artiklit 3,

ning arvestades, et:

direktiivi 76/621/EMÜ artiklis 2 on sätestatud, et alates 1. juulist 1979 ei tohi kõnealuse direktiivi artiklis 1 loetletud toodetes eruukhappe sisaldus olla üle 5 % rasvhapete kogusisaldusest toiduaine rasvkomponendis;

direktiivi 76/621/EMÜ artiklis 3 on sätestatud, et eruukhappesisalduse määramiseks kasutatakse ühenduses kehtivat analüüsimetoodikat;

23. septembri 1968. aasta määruses (EMÜ) nr 1470/68 õlitaimede seemnetest proovide võtmise ja vähendamise ning õliseemnete õli-, lisandi- ja niiskusesisalduse määramise kohta ([2]) sätestatakse määrusega 72/77/EMÜ ([3]) lisatud VI lisas eruukhappesisalduse määramise metoodika rapsi- ja rüpsiseemnetes; seda metoodikat tuleks kasutada sõelanalüüsil;

kui õlides ja rasvades sisalduvate rasvhapete analüüsil kasutatakse tavalistel tingimustel gaasikromatograafilist meetodit, ei ole võimalik eruukhapet eristada teistest dokoseenhappe isomeeridest, näiteks tsetolehappest;

eruukhappesisalduse taset on vaja määrata õlides ja rasvades ning õli- või rasvalisandiga toiduainetes, mis võivad sisaldada tsetolehapet või teisi dokoseenhappe isomeere;

eruukhappesisalduse taset ei ole vaja määrata õlides ja rasvades ning õli- või rasvalisandiga toiduainetes, mille sõelumismeetodil määratud dokoseenhappe või dokoseenhappe *cis*-isomeeride kogusisaldus ei ületa 5 %;

kuni eruukhappe sisalduse määramise täiustatud metoodika kehtestamiseni loetakse seda analüüsimetoodikat käesoleval ajal kõige sobivamaks;

käesoleva direktiiviga sätestatud meetmed on kooskõlas alalise toidukomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

*Artikkel 1*

Liikmesriigid nõuavad, et eruukhappesisalduse määramiseks direktiivi 76/621/EMÜ artiklis 1 nimetatud toodetes kasutataks artiklis 2 sätestatud analüüsimetoodikat.

*Artikkel 2*

1. Sõelanalüüsil kasutatakse üht kahest alljärgnevast meetodist:

a) artiklis 1 osutatud toodetes määratakse määruse (EMÜ) nr 1470/68 VI lisas sätestatud analüüsimetoodika abil dokoseenhappe kogusisaldus; või

b) artiklis 1 osutatud toodetes määratakse määruse (EMÜ) nr 1470/68 VI lisas sätestatud metoodika abil dokoseenhapete *cis*-isomeeride kogusisaldus, kasutades gaasikromatograafiat tingimustes, mille korral dokoseenhappe *cis*- ja *trans*-isomeerid eraldatakse; statsionaarseteks faasideks on sel eesmärgil sobivad näiteks tsüanopropüülpolüsiloksaanid või vedelkristallid.

2. Kui:

a) lõike 1 punkti a kohaselt määratud dokoseenhappe kogusisaldus või

b) lõike 1 punkti b kohaselt määratud dokoseenhappe *cis*-isomeeride kogusisaldus artiklis 1 osutatud toodete

([1]) EÜT L 202, 28.7.1976, lk 35.
([2]) EÜT L 239, 28.9.1968, lk 2.
([3]) EÜT L 12, 15.1.1977, lk 11.

rasvkomponentide rasvhapete kogusisalduse lõikes ei ületa 5 %, ei ole edasine analüüs vajalik. Vastasel korral tuleb eruukhappesisaldus määrata lisas sätestatud metoodika kohaselt.

*Artikkel 3*

Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigus- ja haldusnormid hiljemalt 1. veebruaril 1982. Liikmesriigid teatavad sellest viivitamata komisjonile.

*Artikkel 4*

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 25. juuli 1980

*Komisjoni nimel*

*komisjoni liige*

Étienne DAVIGNON

*LISA*

## ERUUKHAPPESISALDUSE MÄÄRAMINE TOIDUÕLIDES JA -RASVADES NING ÕLI- VÕI RASVALISANDIGA TOIDUAINETES

### I. **SISSEJUHATUS**

1. PROOVI ETTEVALMISTAMINE

1.1. **Üldised nõuded**

Laboratoorseks analüüsiks ette nähtud proovi mass on üldjuhul 50 g, kui ei ole nõutud suuremat kogust.

1.2. **Proovi laboratoorseks analüüsiks ettevalmistamine**

Enne analüüsimist tuleb proov homogeenida.

1.3. **Säilitusanumad**

Eelkirjeldatud viisil ette valmistatud proovi säilitatakse õhu- ja niiskuskindlas anumas.

2. REAKTIIVID

2.1. **Vesi**

2.1.1. Kui lahustamiseks, lahjendamiseks või pesemiseks on tarvis vett, tuleb kasutada destilleeritud, demineraliseeritud või vähemalt sama puhtusastmega vett.

2.1.2. Kui nimetatakse lahustamist või lahjendamist, täpsustamata lahustamiseks või lahjendamiseks mõeldud reaktiivi, on mõeldud vesilahust.

2.2. **Kemikaalid**

Kõik kasutatavad kemikaalid peavad vastama analüütilistele reaktiividele esitatavatele nõuetele, kui ei ole sätestatud teisiti.

3. APARATUUR

3.1. **Aparatuuri loetelu**

Loetelu sisaldab ainult spetsaalaparatuuri või konkreetse spetsifikatsiooni kohast aparatuuri.

3.2. **Analüütilised kaalud**

Analüütiliste kaalude all mõistetakse kaalu, mille tundlikkus on vähemalt 0,1 mg.

4. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

4.1. **Tulemused**

Ametlikus analüüsiaruandes väljendatav tulemus on vähemalt kahe analüüsi keskmine, mille korratavus on rahuldav.

4.2. **Protsendi arvutamine**

Kui ei ole sätestatud teisiti, väljendatakse analüüsi tulemus protsendina (m/m) rasvhapete kogusisaldusest laborisse laekunud proovis.

4.3 **Analüüsi täpsus**

Analüüsi tulemuses sõltub komakohtade arv kasutatud meetodi täpsusest.

## II. **ERUUKHAPPE MÄÄRAMINE**

1. REGULEERIMIS- JA RAKENDUSALA

Meetodi abil määratakse kindlaks eruukhappe sisaldus:

i) tsetolehapet (dokoseenhappe üks *cis*-isomeere, mis esineb kalaõlides) sisaldavates õlides ja rasvades ja

ii) dokoseenhappe *trans*- ja *cis*-isomeere sisaldavates hüdrogeenitud õlides ning rasvades.

2. DEFINITSIOON

Eruukhappesisaldus: esitatud meetodi kohaselt määratud eruukhappe sisaldus.

3. MÄÄRAMISE PÕHIMÕTE

Analüüsitava õli või rasva koostises olevate rasvhapete metüülestrid eraldatakse madalal temperatuuril hõbetatud plaadil planaarkromatograafilisel meetodil ning kvantitatiivanalüüs toimub gaasikromatograafilisel meetodil.

4. REAKTIIVID

4.1. Värskelt destilleeritud peroksiidivaba dietüüleeter.

4.2. n-heksaan.

4.3. Planaarkromatograafiaks silikageel G.

4.4. Kolonnkromatograafiaks silikageel.

4.5. Hõbenitraadi lahus, 200 g/l. Lahustada vees 24 g hõbenitraati ja täiendada maht veega 120 milliliitrini.

4.6. Metüülerukaadi lahus, 5 mg/ml. Lahustada 50 mg metüülerukaati mõnes milliliitris n-heksaanis ning lahjendada n-heksaaniga 10 milliliitrini.

4.7. Metüültetrakosanaadi lahus, sisestandard, 0,25 mg/ml. Lahustada 25 mg metüültetrakosanaati mõnes milliliitris n-heksaanis (nagu alapunktis 4.6) ning lahjendada n-heksaaniga 100 milliliitrini.

4.8. Ilmutuslahus. Tolueeni ja n-heksaani lahus mahuvahekorras 90: 10.

4.9. 2,7-diklorofluorestseiini lahus, 0,5 g/l. Lahustada 50 mg 2,7-diklorofluorestseiini soojendades ja segades 100 ml 50 % metanooli vesilahuses.

5. APARATUUR

5.1. Planaarkromatograafiaks vajalik aparatuur, sealhulgas:

5.1.1. Sügavkülmuti, mis võimaldaks ilmutustanki ja selle sisu hoida temperatuuril –20…–25 °C.

5.1.2. Klaasplaadid mõõtmetega 200 × 200 mm.

5.1.3. Ultraviolettlamp.

5.1.4. Klaaskolonnid kõrgusega umbes 200 mm ja sisemise läbimõõduga umbes 10 mm, milles on klaasfilter või filtreerimismaterjaliks klaasvill. Kasutada võib ka väikesi klaasfilterlehtreid.

5.1.5. Aplikaator lahusetriipude või -ribade plaatidele kandmiseks.

5.2. Gaasikromatograaf koos elektronintegraatoriga vastavalt komisjoni määruse (EMÜ) nr 72/77 VI lisa III jaos antud kirjeldusele.

6. TÖÖ KÄIK

6.1. **Rasvhappe metüülestrite ettevalmistamine**

Võtta analüüsiks mõeldud proovist umbes 400 mg õli või rasva ning valmistada 20–50 mg/ml metüülestrite ja n-heksaani lahus vastavalt komisjoni määruse (EMÜ) nr 72/77 VI lisa II jao punktis 3 kirjeldatud meetodile.

6.2. **Planaarkromatograafia**

6.2.1. *Plaatide ettevalmistamine*

500 ml ümarkolvi põhja panna 60 g silikageeli (4.3), lisada sellele 120 ml hõbenitraadi lahust (4.5) ning loksutada ühe minuti vältel täielikult homogeense suspensiooni saamiseni. Suspensioon kanda tavalisel viisil plaatidele; kihi paksus peaks olema umbes 0,5 mm. Suspensiooni kogusest jätkub viie 200 × 200 mm plaadi katmiseks.

Plaatidel lasta õhu käes osaliselt kuivada (soovitavalt hoides plaate 30 minuti jooksul pimedas). Plaadid kuivatada täielikult ning aktiveerida nad, paigutades nad kaheks tunniks ja 30 minutiks 100 °C ahju. Plaate tuleb kasutada võimalikult kohe pärast aktiveerimist või paigutada nad hoolikalt pimedasse kappi ning aktiveerida plaadid enne kasutamist uuesti. (Märkus: rahuldava tulemuse võib anda plaatide aktiveerimine 110 °C juures ühe tunni jooksul, kui nad aktiveerimise käigus ei tumene). Servamoonutuste vähendamiseks tõmmata plaadi külgservadest ja ülemisest servast 10 mm kaugusele läbi kattekihi kriipsud.

6.2.2. *Metüülestrite pealekandmine*

Aplikaatori (5.1.5) abil kanda proovist saadud metüülestrite lahusest (6.1) 50 µl umbes 50 mm pikkuse kitsa ribana plaadile, plaadi külgservadest vähemalt 40 mm ja alumisest servast vähemalt 10 mm kaugusele. Samamoodi kanda plaadile 100 µl lahust, mis sisaldab võrdses koguses ettevalmistatud metüülestrite lahust (6.1) ja metüülerukaadi lahust. Lahuste plaadile kandmisel tuleb olla ettevaatlik, kuna plaadi kate on õrn. (Märkus: soovi korral võib plaadile lisaks kanda ka 50 µl metüülerukaadi lahust (4.6), mis aitab pärast ilmutamist kromatogrammil ära tunda metüülerukaadi riba: vt joonist). Pärast metüülestrite plaadile kandmist asetada plaadi alumine serv dietüüleetrisse, kuni eeter on liikunud plaadile kantud proovist umbes 5 mm ülespoole. Sel moel moodustavad metüülestrid plaadil kitsa riba.

6.2.3. *Plaatide ilmutamine*

Ilmutuslahus (4.8) valada umbes 5 mm kõrguselt ilmutusvanni ning asetada see kaanega kaetult sügavkülmutisse (5.1.1) temperatuuril –25 °C või võimalikult selle lähedasel temperatuuril. (Mõnel juhul on otstarbekas ilmutusvann vooderdada). Kahe tunni pärast asetada plaat ettevaatlikult ilmutusvanni ning lasta lahustil tõusta pooleni või kahe kolmandikuni plaadi kõrgusest. Plaat eemaldada ning aurustada lahusti ettevaatlikult lämmastikujoa abil. Asetada plaat tagasi vanni ja lasta lahustil tõusta plaadi ülemise servani. Plaat eemaldada ning kuivatada eelkirjeldatud viisil lämmastikujoa abil. Seejärel pihustada plaat ettevaatlikult üle 2,7-diklorofluorestsiini lahusega (4.9).

Plaati vaadelda ultraviolettkiirte all ning määrata kindlaks proovi metüülerukaadi riba asukoht võrreldes intensiivsema ribaga selles proovis, millele on lisatud metüülerukaati (vt joonis).

6.2.4. *Metüülestri fraktsioonide eraldamine*

Metüülerukaati sisaldav riba kraapida plaadilt ettevaatlikult 50 ml keeduklaasi, vältides kadusid. Samal viisil kraapida plaadilt teise 50 ml keeduklaasi metüülerukaadi ribast all- ja ülalpool olev silikageel. See riba sisaldab kõiki teisi rasvhapete metüülestrite fraktsioone. Lisada kummassegi keeduklaasi 1,0 ml metüültetrakosanaadi standardlahust (4.7) ja 10 ml dietüüleetrit (4.1). Segada ning valada keeduklaaside sisu eraldi kolonnidesse või lehtritesse (5.1.4), millest kumbki sisaldab umbes 1 g silikageeli (4.4); metüülestrid pesta välja, kasutades selleks kolm või neli korda 10-milliliitrist dietüüleetri kogust. Filtraadid koguda väikestesse kolbidesse. Filtraatidest aurustada liigne vedelik kerge lämmastikujoa abil ning panna metüülestrid väikestesse koonilise otsaga katseklaasidesse. Järelejäänud lahusti eemaldada lämmastikujoa abil selliselt, et metüülestrid kontsentreeruksid katseklaasi põhja. Metüülestrid lahustada umbes 25–50 µl n-heksaanis (4.2).

6.3. **Gaasikromatograafia**

6.3.1. Viia läbi komisjoni määruse 72/77/EMÜ VI lisa III jaos kirjeldatud protseduur ja analüüsida 1–2 µl metüülestrite lahust, mis on saadud (i) metüülerukaati sisaldavast fraktsioonist ja (ii) ülejäänud metüleeritud rasvhappeid sisaldavast fraktsioonist.

6.3.2. Leida elektronintegraatori abil järgmised piigid:

i) metüülerukaati sisaldava fraktsiooni kromatogrammil:

a) metüülerukaat [E]

b) sisestandard [$L_1$]

c) kogu metüülestri (v.a sisestandard) piigi pindala [EF]

ii) ülejäänud rasvhapete metüülestreid sisaldava fraktsiooni kromatogrammil:

a) kogu metüülestri (v.a sisestandard) piigi pindala [RF]

b) sisestandard [$L_2$]

7. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

7.1. **Arvutusmeetod ja valem**

7.1.1. Eruukhappe sisaldus proovis väljendatakse proovis sisalduvate metüülestrite koguse suhtarvuna proovist saadud rasvhapete metüülestrite üldkogusest ja arvutatakse järgmise valemi abil:

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

kus

E, EF, RF $L_1$ ja $L_2$ on alapunktis 6.3.2 nimetatud piigid, mis on vajaduse korral kalibreerimisfaktori abil korrigeeritud.

Praktilistel kaalutlustel on ülaltoodud valemi abil väljendatud metüülerukaadisisaldus võrdne proovis oleva eruukhappe protsendiga rasvhapete koguhulgast.

7.1.2. Kui piigid väljendatakse protsendina, võib EF ja RF väärtused arvutada järgmiste valemite abil:

$EF = 100 - L_1$

$RF = 100 - L_2$

7.1.3. Alapunktis 7.1.1 esitatud arvutusmeetod eeldab, et proovis esinev tetrakosaanhappe hulk on tühine. Juhul, kui seda hapet esineb märkimisväärses koguses, tuleb ülejäänud rasvhapete metüülestreid sisaldavate fraktsioonide kromatogrammilt nähtuva tetrakosaanhappe kogust ($L_2$) vähendada järgmise tehte abil:

$L_2 - T_2$

kus

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

ja kus

$T_2$ = proovist saadud ning ülejäänud rasvhapete metüülestrite fraktsiooni kromatogrammil sisestandardi osaks oleva metüültetrakosanaadi piigi pindala

$P_2$ = ülejäänud fraktsiooni kromatogrammi metüülpalmitaadi piigi pindala

$T_0$ = käesoleva direktiivi artiklis 2 osutatud analüüsi teel määratud rasvhapete üldkoguse metüülestrite kromatogrammilt võetud metüültetrakosanaadi piigi pindala

$P_0$ = käesoleva direktiivi artiklis 2 osutatud analüüsi teel määratud rasvhapete üldkoguse metüülestrite kromatogrammilt võetud metüülpalmitaadi piigi pindala.

7.1.4. *Valemi tuletamine*

Rasvhapete osakaal metüülerukaati sisaldavas fraktsioonis väljendatakse protsendina proovis sisalduvate rasvhapete üldkogusest ja arvutatakse järgmise valemi abil:

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

Eruukhappe osakaal metüülerukaati sisaldavas fraktsioonis arvutatakse järgmise valemi abil:

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

Sellest tulenevalt leitakse eruukhappe osakaal proovis, väljendatuna protsendina rasvhapete üldkogusest, järgmise valemi abil:

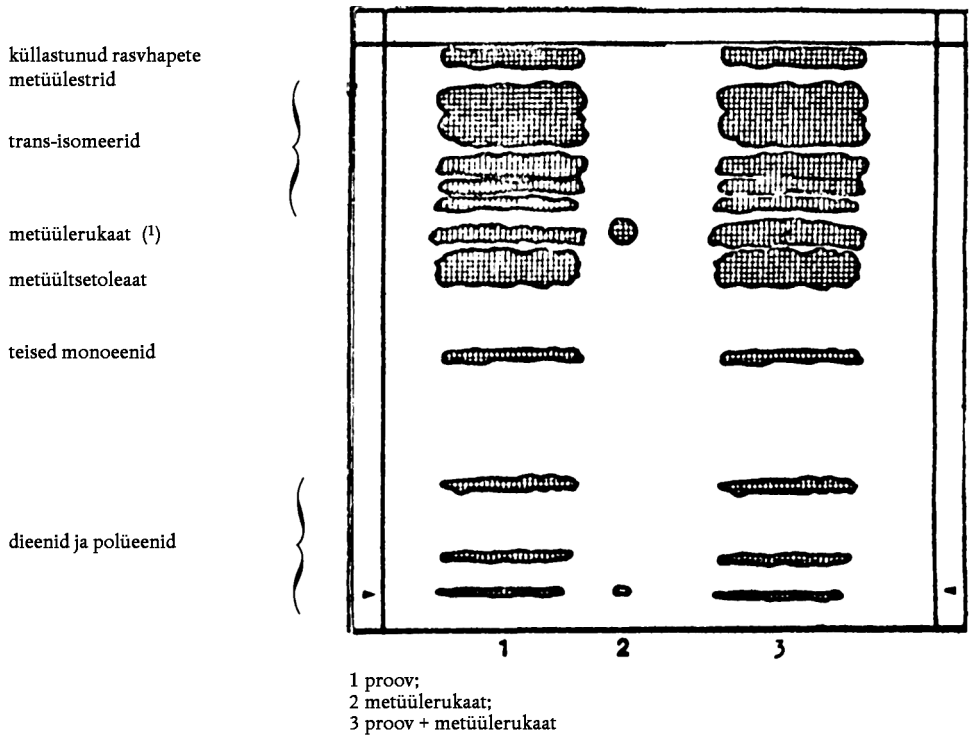
$$\frac{EF}{L_1\left(\frac{EF}{L_1}+\frac{RF}{L_2}\right)} \times \frac{E}{EF} \times 100 \qquad \text{või} \qquad \frac{E}{L_1\left(\frac{EF}{L_1}+\frac{RF}{L_2}\right)} \times 100$$

7.1.5. *Korratavus*

Sama analüüsija poolt samades tingimustes sama prooviga samaaegselt või kiiresti teineteise järel tehtud kahe analüüsi tulemused ei tohi erineda rohkem kui 10 % või 0,5 g proovi iga 100 grammi kohta, olenevalt sellest, kumb väärtus on suurem.

JOONIS

**Tüüpiline planaarkromatogramm, millel on näha eruukhappe, tsetolehappe ja dokoseenhappe *trans*-isomeeride metüülestrite eraldumine**




1 proov;
2 metüülerukaat;
3 proov + metüülerukaat

(1) Metüülerukaadi fraktsioon sisaldab tavaliselt ka teiste monoeenhapete metüülestreid, kuid ei tohiks sisaldada metüültsetoleaati.