31980L0891

27.9.1980 ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV L 254/35

SMERNICA KOMISIE

z 25. júla 1980

týkajúca sa analytickej metódy spoločenstva na stanovenie obsahu kyseliny erukovej v olejoch a tukoch určených pre ľudskú spotrebu a v potravinách obsahujúcich pridané oleje a tuky

(80/891/EHS)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 76/621/EHS z 20. júla 1976 týkajúcu sa stanovenia maximálneho obsahu kyseliny erukovej v olejoch a tukoch, ktoré sú určené pre ľudskú spotrebu a v potravinách obsahujúcich pridané oleje alebo tuky [1], najmä na jej článok 3,

keďže článok 2 smernice 76/621/EHS stanovuje, že od 1. júla 1979 obsah výrobkov kyseliny erukovej uvedených v článku 1 tejto smernice prepočítaný na celkovú hladinu mastných kyselín v zložke tuku nemôže byť vyšší ako 5 %;

keďže článok 3 smernice 76/621/EHS stanovuje, že obsah kyseliny erukovej sa stanoví analytickou metódou spoločenstva;

keďže nariadenie (EHS) č. 1470/68 z 23. septembra 1968 o výbere a redukcii vzoriek a o určení obsahu olejov, nečistôt a vlhkosti v olejových semenách [2], predpisujúce, v prílohe VI, v zmysle nariadenia (EHS) č. 72/77 [3], analytickú metódu stanovujúcu obsah kyseliny erukovej v semenách repky a repky olejnej; keďže táto metóda by sa mala použiť ako čistiaca metóda;

keďže pri analyzovaní mastných kyselín v olejoch a tukoch plynovo-kvapalnou chromatografiou za normálnych podmienok nie je možné rozlíšiť kyselinu erukovú od ostatných izomérov kyseliny dokozánovej, ako je napríklad kyselina cetylolejová;

keďže je nevyhnutné určiť hladinu kyseliny erukovej v olejoch a tukoch ako aj v potravinách, do ktorých boli pridané oleje a tuky, ktoré môžu obsahovať kyselinu cetylolejovú a ďalšie izoméry kyseliny dokozánovej;

keďže hladinu kyseliny erukovej nie je potrebné stanoviť v olejoch a tukoch a v potravinách, do ktorých boli pridané oleje a tuky, u ktorých na základe použitia čistiacich analytických metód bolo zistené, že neobsahujú celkovo viac ako 5 % kyseliny dokozánovej alebo cis-dokozánovej;

keďže až do obdobia zavedenia vylepšenej analytickej metódy stanovenia kyseliny erukovej je táto analytická metóda považovaná v súčasnosti za najvhodnejšiu;

keďže opatrenia stanovené touto smernicou sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potraviny,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty požadujú, aby analýzy, ktoré sú nevyhnutné na stanovenie obsahu kyseliny erukovej vo výrobkoch uvedených v článku 1 smernice 76/621/EHS, boli uskutočnené v súlade s článkom 2.

Článok 2

1. Na účely čistenia sa stanoví buď:

a) celkový obsah kyseliny dokozánovej pri výrobkoch uvedených v článku 1 podľa metódy uvedenej v prílohe VI nariadenia (EHS) č. 1470/68; alebo

b) celkový obsah kyseliny cis-dokozánovej pri výrobkoch uvedených v článku 1 podľa metódy uvedenej v prílohe VI nariadenia (EHS) č. 1470/68 použitím plynovo-kvapalnej chromatografie za podmienok, pri ktorých sú oddelené cis- a trans- izoméry kyseliny dokozánovej; stacionárne fázy vhodné na tento účel sú napríklad kyanopropylpolysiloxány alebo tekuté kryštály.

2. Ak celkový obsah, buď:

a) kyseliny dokozánovej stanovený podľa odseku 1 písm. a), alebo

b) kyseliny cis-dokozánovej stanovený podľa odseku 1 písm. b)

[1] Ú. v. ES L 202, 28.7.1976, s. 35.
[2] Ú. v. ES L 239, 28.9.1968, s. 2.
[3] Ú. v. ES L 12, 15.1.1977, s. 11.

pri výrobkoch uvedených v článku 1 prepočítaný na celkový obsah mastných kyselín v zložke tuku neprekročí 5 %, nepožaduje sa ďalšie stanovenie. V inom prípade sa obsah kyseliny erukovej stanoví metódou uvedenou v prílohe.

Článok 3

Členské štáty prijmú zákony, iné právne predpisy alebo správne opatrenia, ktoré sú v súlade s touto smernicou, najneskôr do 1. februára 1982. Okamžite o tom informujú Komisiu.

Článok 4

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 25. júla 1980

Za Komisiu

Étienne DAVIGNON

člen Komisie

PRÍLOHA

STANOVENIE OBSAHU KYSELINY ERUKOVEJ V OLEJOCH A TUKOCH URČENÝCH PRE ĽUDSKÚ SPOTREBU A V TUKOVEJ ALEBO OLEJOVEJ ZLOŽKE POTRAVÍN, DO KTORÝCH BOLI PRIDANÉ OLEJE ALEBO TUKY

I. ÚVOD

1. PRÍPRAVA VZORIEK

1.1. **Všeobecne**

Množstvo vzorky na laboratórnu analýzu je obyčajne 50 g, ak nie požadované väčšie množstvo.

1.2. **Príprava vzorky na analýzu v laboratóriu**

Pred analýzou musí byť vzorka homogenizovaná.

1.3. **Nádoby**

Takto pripravená vzorka sa uschová vo vzduchotesnej a vlhkovzdornej nádobe.

2. CHEMICKÉ ČINIDLÁ

2.1. **Voda**

2.1.1. Tam, kde sa požaduje voda ako rozpúšťadlo, riedidlo alebo na umývanie, použije sa destilovaná voda alebo demineralizovaná voda prinajmenšom ekvivalentnej čistoty.

2.1.2. Tam, kde sa uvádza „roztok“ alebo „riedidlo“ bez špecifikovania ďalšieho chemického činidla, myslí sa tým vodný roztok alebo riedidlo.

2.2. **Chemikálie**

Všetky použité chemikálie majú uznanú analytickú kvalitu s výnimkou, ak sú špecifikované inak.

3. APARATÚRA

3.1. **Zoznam aparatúry**

Tento zoznam obsahuje iba súčasti, ktoré majú špeciálne použitie a špecifikáciu.

3.2. **Analytické váhy**

„Analytické váhy“ znamenajú váhy s citlivosťou 0,1 mg alebo lepšou.

4. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

4.1. **Výsledky**

Výsledok uvedený v oficiálnej analytickej správe je stredná hodnota získaná z nie menej ako dvoch stanovení, reprodukovateľnosť ktorých je vyhovujúca.

4.2. **Percentuálny výpočet**

Ak nie je uvedené inak, výsledky sú vyjadrené ako percentuálny podiel (m/m) celkových mastných kyselín vo vzorke obdržanej laboratóriom.

4.3. **Počet platných číslic**

Počet platných číslic v takto vyjadrenom výsledku sa stanoví podľa presnosti metódy.

II. **STANOVENIE KYSELINY ERUKOVEJ**

1. ROZSAH A OBLASŤ POUŽITIA

Metóda stanovuje obsah kyseliny erukovej v:

i) olejoch a tukoch obsahujúcich kyselinu cetylolejovú (predovšetkým cis-izomér kyseliny dokozánovej, ktorý sa nachádza v rybích olejoch), a

ii) stužených olejoch a tukoch obsahujúcich trans a cis-izoméry kyseliny dokozánovej.

2. DEFINÍCIA

Obsah kyseliny erukovej: obsah kyseliny erukovej tak, ako je stanovený špecifikovanou metódou.

3. PRINCÍP

Metylestery jednotlivých mastných kyselín olejov alebo tukov sú oddelené nízkotepelnou striebornou chromatografiou na tenkej vrstve a kvantitatívne stanovené plynovo-kvapalnou chromatografiou.

4. CHEMICKÉ ČINIDLÁ

4.1. Dietyléter čerstvo destilovaný bez obsahu peroxidu.

4.2. n-hexán.

4.3. Silikagél G na chromatografiu na tenkej vrstve.

4.4. Silikagél na stĺpcovú chromatografiu.

4.5. Roztok dusičnanu strieborného, 200g/liter. Rozpustite 24 g dusičnanu strieborného vo vode a doplňte vodou do 120 ml.

4.6. Roztok metylerukátu 5 mg/ml. Rozpustite 50 mg metylerukátu v niekoľkých ml n-hexánu a zrieďte n-hexánom na 10 ml.

4.7. Metyltetrakozanát, vnútorný štandardný roztok, 0,25 mg/ml. Rozpustite 25 mg metyltetrakozanátu v niekoľkých ml n-hexánu (ako 4.6) a zrieďte n-hexánom na 100 ml.

4.8. Vývojka. Toluén: n-hexán 90:10 (v/v).

4.9. Roztok 2,7 dichlórfluoresceínu 0,5 g/liter. Rozpustite zahrievaním a miešaním 50 mg 2,7 dichlórfluoresceínu v 100 ml 50 % vodného roztoku metanolu.

5. APARATÚRA

5.1. Aparatúra na chromatografiu na tenkej vrstve obsahuje najmä:

5.1.1. Zariadenie na hlboké zmrazovanie schopné udržať vývojnicu a obsah pri teplote od mínus 20 do mínus 25 °C.

5.1.2. Sklené platne, 200 x 200 mm.

5.1.3. Ultrafialová lampa.

5.1.4 Sklené kolóny, dĺžka asi 200 mm, vnútorný priemer asi 10mm s filtrom zo sklenej vaty alebo sintrovaného skla. Prípadne malé lieviky s filtrom zo sintrovaného skla.

5.1.5. Aplikátor na nanášanie roztokov vo forme úzkych pásov alebo pruhov na TLC platne.

5.2. Plynovo-kvapalný chromatograf spolu s elektronickým integrátorom v súlade s popisom v časti III prílohy VI k nariadeniu Komisie (EHS) č. 72/77.

6. POSTUP

6.1. **Príprava metylesterov mastných kyselín**

Odoberte asi 400 mg olejovej alebo tukovej zložky z analyzovanej vzorky a pripravte roztok, ktorý obsahuje asi 20 až 50 mg/ml metylesterov mastnej kyseliny v n-hexáne, metódou popísanou v časti II.3 prílohy VI k nariadeniu Komisie (EHS) č. 72/77.

6.2. **Chromatografia na tenkej vrstve**

6.2.1. *Príprava platní*

Vložte 60 g silikagélu (4.3) do 500 ml banky s guľatým dnom, pridajte 120 ml roztoku dusičnanu strieborného (4.5) a nechajte trepať jednu minútu, aby ste získali úplne homogénnu suspenziu. Suspenziu naneste bežným spôsobom na platne; hrúbka vrstvy by mala byť približne 0,5 mm. Toto množstvo suspenzie postačuje na prípravu piatich platní rozmerov 200 x 200 mm.

Nechajte platne čiastočne voľne vyschnúť (pokiaľ možno uložte ich na tmavom mieste asi na 30 minút). Pre úplné vysušenie a aktivovanie vložte platne na dve a pol hodiny do sušiarne pri teplote 100°C. Použite platne čo možno najskôr po aktivovaní alebo ich opatrne uchovajte v tmavej komore a potom pred použitím reaktivujte. (Poznámka: aktivácia pri 110 °C jednu hodinu sa považuje za dostatočnú za predpokladu, že platne pri tom nestmavnú.) Pred použitím vyryte do nanášacej vrstvy línie vo vzdialenosti 10 mm od okrajov a vrcholov každej platne, čím sa redukuje okrajový efekt počas vyvíjania.

6.2.2. *Nanášanie metylesterov*

Použitím aplikátora (5.1.5) naneste 50 µl roztoku metylesterov (6.1) pripravených zo vzorky v úzkom pruhu dlhom asi 50 mm, aspoň 40mm od bočného okraja platne a 10mm od spodného okraja. Podobným spôsobom naneste 100 µl roztoku obsahujúceho rovnaký objem pripraveného roztoku metylesterov (6.1) a roztok metylerukátu (4.6). Venujte pozornosť nanášaniu roztokov, pretože nanášacia vrstva je krehká. (Poznámka: ak je to žiadúce, 50 µl roztoku metylerukátu (4.6) možno naniesť na platňu ako pomôcku na identifikovanie pásu metylerukátu po vyvíjaní: pozri obrázok). Po nanesení metylesterov ponechajte spodný okraj platne v dietyléteri, kým éter vystúpi asi 5 mm nad oblasť nanášania vzorky. Tým sa metylestery koncentrujú do úzkeho pásu.

6.2.3. *Vyvíjanie platní*

Nalejte vývojku (4.8) do vývojnice do výšky asi 5 mm a uložte vývojnicu doplnenú vekom do zariadenia na hlboké zmrazovanie (5.1.1) uchovaného pri mínus 25°C alebo čo možno najbližšie k tejto teplote. (V niektorých prípadoch môže byť výhodné vývojnicu obložiť.) Po dvoch hodinách vložte platňu opatrne do vývojnice a nechajte roztok vystúpiť do polovice až do dvoch tretín výšky platne. Platňu vytiahnite a jemne z nej nechajte vyparіť roztok v prúde dusíka. Znovu vložte platňu do vývojnice a nechajte roztok vystúpiť po vrchný okraj platne. Platňu vytiahnite a ako predtým vysušte v prúde dusíka a potom opatrne postriekajte roztokom 2,7 dichlórfluoresceínu (4.9).

Platňu prezrite pod ultrafialovým svetlom a určite pás vo vzorke obsahujúci metylerukát porovnaním s intenzívnym pásom vo vzorke, do ktorej bol pridaný metylerukát (pozri obrázok).

6.2.4. *Separácia metylesterových frakcií*

Zoškriabte pás metylerukátu pochádzajúci zo vzorky do 50 ml kadičky a dbajte, aby ste sa vyhli stratám. Podobne preneste silikagél nachádzajúci sa nad a pod pásom metylerukátu do ďalšej 50 ml kadičky. Tento pás obsahuje všetky ostatné frakcie metylesterov mastných kyselín. Do každej kadičky pridajte 1 ml štandardného roztoku metyltetrakozanátu (4.7) a 10 ml dietyléteru (4.1). Pomiešajte a preneste obsahy kadičiek jednotlivo do kolón alebo lievikov (5.1.4), ktoré obsahujú asi 1 g silikagélu (4.4). Vylúhujte metylestery tromi alebo štyrmi 10 ml dávkami dietyléteru. Filtráty zbierajte do malých baniek. Vyparovaním znížte objem každého filtrátu pod jemným prúdom dusíka a preneste metylestery do malých sklenených skúmaviek so špicatým dnom. Odstráňte celý roztok vyparením v prúde dusíka tak, aby sa koncentrát metylesterov sústredil na dne skúmaviek. Rozpustite metylestery v 25 až 50 µl n-hexánu (4.2).

6.3. **Plynovo- kvapalná chromatografia**

6.3.1. Postupujte spôsobom opísaným v časti III prílohy VI k nariadeniu Komisie 72/77/EHS a analyzujte 1 až 2 µl roztokov metylesterov získaných z i) frakcie obsahujúcej metylerukát a ii) frakcií obsahujúcich zvyšok metylovaných mastných kyselín.

6.3.2. Z elektronického integrátora vyberte nasledujúce oblasti vrcholov:

i) z chromatogramu frakcie obsahujúcej metylerukát:

a) metylerukát [E]

b) vnútorný štandard [L_1]

c) všetky metylesterové oblasti vrcholov okrem vnútorného štandardu [EF]

ii) z chromatogramu frakcií obsahujúcich zvyšok metylesterov mastných kyselín:

a) všetky metylesterové oblasti vrcholov okrem vnútorného štandardu [RF]

b) vnútorný štandard [L_2]

7. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

7.1. **Metóda výpočtu a vzorec**

7.1.1. Obsah kyseliny erukovej vo vzorke vyjadrený jej metylesterom ako percentuálny podiel všetkých metylesterov mastných kyselín získaných zo vzorky je daný nasledovne:

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

kde

E, EF, RF, L_1 a L_2 sú oblasti vrcholov uvedené v 6.3.2, ak je to nevyhnutné, korigované použitím kalibračných faktorov.

Na praktické účely je hodnota metylerukátu získaná horeuvedeným vzorcom ekvivalentná hladine kyseliny erukovej vyjadrenej ako percento celkovej hladiny mastných kyselín vo vzorke.

7.1.2. Ak sú oblasti vrcholov získané v percentách, hodnoty pre EF a RF môžu byť vypočítané nasledovným spôsobom:

$EF = 100 - L_1$

$RF = 100 - L_2$

7.1.3. Metóda výpočtu (7.1.1) predpokladá, že hladina kyseliny tetrakozánovej vo vzorke je nepatrná. Ak sa preukáže prítomnosť väčšieho množstva tejto kyseliny, množstvo kyseliny tetrakozánovej (L_2) získané z chromatogramu frakcií obsahujúcich zvyšok metylesterov mastných kyselín sa musí zredukovať na:

$L_2 - T_2$

kde

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

a

T_2 = oblasť vrcholu metyltetrakozanátu stanovená zo vzorky a ktorá tvorí časť oblasti vrcholu prisudzovanej vnútornému štandardu v chromatograme zvyškovej frakcie metylesterov mastných kyselín

P_2 = oblasť vrcholu metylpalmitátu získaná z chromatogramu zvyškovej frakcie

T_0 = oblasť vrcholu metyltetrakosanátu získaná z chromatogramu metylesterov všetkých mastných kyselín, ako je to stanovené analýzou uvedenou v článku 2 tejto smernice

P_0 = oblasť vrcholu metylpalmitátu získaná z chromatogramu metylesterov všetkých mastných kyselín, ako je to stanovené analýzou uvedenou v článku 2 tejto smernice.

7.1.4. *Odvodenie vzorca*

Podiel mastných kyselín vo frakcii obsahujúcej metylerukát vyjadrený ako percentuálny podiel všetkých mastných kyselín vo vzorke je daný takto:

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

Podiel kyseliny erukovej vo frakcii obsahujúcej metylerukát je daný takto:

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

Teda obsah kyseliny erukovej vo vzorke vyjadrený ako percento všetkých mastných kyselín je daný takto:

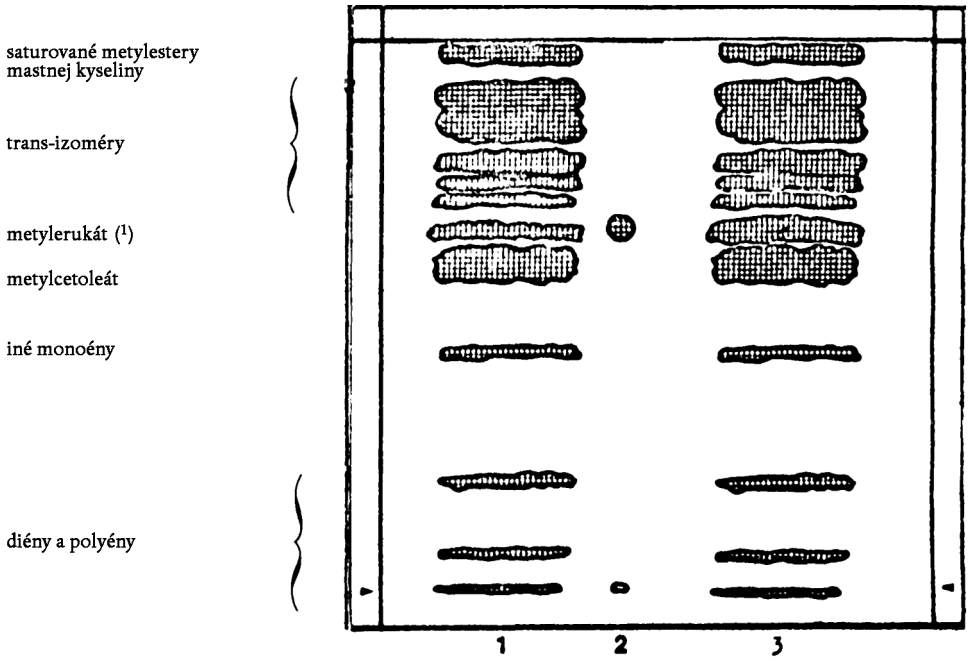
$$\frac{EF}{L_1\left(\frac{EF}{L_1}+\frac{RF}{L_2}\right)} \times \frac{E}{EF} \times 100 \qquad \text{alebo} \qquad \frac{E}{L_1\left(\frac{EF}{L_1}+\frac{RF}{L_2}\right)} \times 100$$

7.1.5. *Reprodukovateľnosť*

Rozdiel medzi hodnotami dvoch stanovení uskutočnených súčasne alebo v rýchlej postupnosti na tej istej vzorke tým istým analytikom za tých istých podmienok nie je vyšší ako 10 % alebo 0,5 g na 100 g vzorky berúc väčšiu hodnotu.

OBRÁZOK

Typický tenkovrstvový chromatogram zobrazujúci separáciu metylesterov kyseliny erukovej, kyseliny cetylolejovej a trans-izomérov kyseliny dokozánovej



1 vzorka;
2 metylerukát;
3 vzorka + metylerukát

(1) Frakcia určujúca metylerukát bude zvyčajne obsahovať metylestery iných monoénových kyselín, ale nemala by obsahovať metylcetolát.