

31980L0891

27.9.1980

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

L 254/35

SMĚRNICE KOMISE

ze dne 25. července 1980

o analytické metodě Společenství pro stanovení obsahu kyseliny erukové v olejích a tucích určených jako takových k lidské spotřebě a v potravinách obsahujících přidané oleje nebo tuky

(80/891/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 76/621/EHS ze dne 20. července 1976, kterou se stanoví nejvyšší množství kyseliny erukové v olejích a tucích určených jako takových k lidské spotřebě a v potravinách obsahujících přidané oleje nebo tuky⁽¹⁾, a zejména na článek 3 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že článek 2 směrnice 76/621/EHS stanoví, že nejpozději od 1. července 1979 nesmí být množství kyseliny erukové u produktů uvedených v článku 1 uvedené směrnice vztažené na celkové množství mastných kyselin v tukové složce vyšší než 5 %;

vzhledem k tomu, že článek 3 směrnice 76/621/EHS stanoví, že obsah kyseliny erukové bude stanoven analytickou metodou Společenství;

vzhledem k tomu, že nařízení (EHS) č. 1470/68 ze dne 23. září 1968 o odběru a úpravě vzorků a o stanovení obsahu oleje, nečistot a vlhkosti v olejnatých semenech⁽²⁾ stanoví v příloze VI zavedené nařízením (EHS) č. 72/77⁽³⁾ analytickou metodu pro stanovení obsahu kyseliny erukové v semenu řepky a řepice; že by tato metoda měla být použita jako preselekcční metoda;

vzhledem k tomu, že při analýze mastných kyselin, které tvoří základní složku olejů a tuků, nelze metodou plynové chromatografie s kapalnou stacionární fází za normálních podmínek rozlišit kyselinu erukovou od jiných izomerů kyseliny dokosenové, jako je kyselina cetolejová;

vzhledem k tomu, že je nezbytné stanovit množství kyseliny erukové v olejích a tucích a stejně tak v potravinách, do kterých byly přidány oleje nebo tuky, jež mohou obsahovat kyselinu cetolejovou a jiné izomery kyseliny dokosenové;

vzhledem k tomu, že není třeba stanovit množství kyseliny erukové v olejích a tucích a v potravinách, do kterých byly

oleje nebo tuky přidány, pokud bylo preselekcčními analytickými metodami zjištěno, že neobsahují celkově více než 5 % kyseliny dokosenové nebo cisdokosenové;

vzhledem k tomu, že až do zavedení dokonalejší analytické metody pro stanovení kyseliny erukové je tato metoda analýzy v současnosti považována za nejvhodnější;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potraviny,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy stanoví, že analýza nezbytná pro stanovení obsahu kyseliny erukové v produktech uvedených v článku 1 směrnice 76/621/EHS se provádí způsobem stanoveným v článku 2.

Článek 2

1. Pro účely preselektce musí být stanoven:

a) buď celkový obsah kyseliny dokosenové v produktech uvedených v článku 1 pomocí metody uvedené v příloze VI nařízení (EHS) č. 1470/68;

b) nebo celkový obsah kyseliny cis-dokosenové v produktech uvedených v článku 1 metodou uvedenou v příloze VI nařízení (EHS) č. 1470/68 pomocí plynové chromatografie s kapalnou stacionární fází za podmínek, které umožňují oddělit cis- a trans-izomery kyseliny dokosenové. Stacionární fáze vhodné pro tento účel jsou například kyanopropylpolysiloxany nebo tekuté krystaly.

2. Pokud celkový obsah:

a) kyselin dokosenových stanovených podle odst. 1 písm. a) nebo

⁽¹⁾ Úř. věst. L 202, 28.7.1976, s. 35.

⁽²⁾ Úř. věst. L 239, 28.9.1968, s. 2.

⁽³⁾ Úř. věst. L 12, 15.1.1977, s. 11.

- b) kyselin cis-dokosenových stanovených podle odst. 1 písm. b) v produktech uvedených v článku 1 vztažený na celkový obsah mastných kyselin tukové složky těchto výrobků není vyšší než 5 %, nevyžaduje se další stanovení. V opačném případě se obsah kyseliny erukové stanoví metodou uvedenou v příloze této směrnice.

Článek 3

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí do 1. února 1982. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Článek 4

Tato směrnice je určena členskými státy.

V Bruselu dne 25. července 1980.

Za Komisi

Étienne DAVIGNON

člen Komise

PŘÍLOHA

STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY ERUKOVÉ V OLEJÍCH A TUCÍCH URČENÝCH JAKO TAKOVÝCH K LIDSKÉ SPOTŘEBĚ A V TUKOVÉ NEBO OLEJOVÉ SLOŽCE POTRAVIN, DO KTERÝCH BYLY OLEJE NEBO TUKY PŘIDÁNY

I. ÚVOD

1. PŘÍPRAVA VZORKU

1.1. **Obecně**

Hmotnost vzorku dodaného laboratoři k analýze je za normálních podmínek 50 g, pokud není požadováno větší množství.

1.2. **Příprava vzorku k analýze v laboratoři**

Vzorek musí být před analýzou homogenizován.

1.3. **Skladovací nádoby**

Takto připravený vzorek se skladuje ve vzduchotěsné a vlhкотěsné nádobě.

2. REAKČNÍ ČINIDLA

2.1. **Voda**

2.1.1. K rozpouštění, ředění a promývání se použije destilovaná nebo demineralizovaná voda alespoň rovnocenné čistoty.

2.1.2. Pokud není při zmínce o „rozpuštění“ nebo „ředění“ uvedeno žádné jiné činidlo, jedná se o rozpouštění nebo ředění vodou.

2.2. **Chemikálie**

Používají se pouze chemikálie analytické čistoty (p. a.), pokud není uvedeno jinak.

3. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

3.1. **Seznam přístrojů**

Tento seznam obsahuje pouze položky pro zvláštní účel a se specifikací.

3.2. **Analytické váhy**

„Analytickými váhami“ se rozumějí váhy s citlivostí 0,1 mg nebo větší.

4. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

4.1. **Výsledky**

V úřední zprávě o analýze se uvede střední hodnota nejméně ze dvou stanovení s uspokojivou opakovatelností.

4.2. **Výpočet procentního obsahu**

Pokud není stanoveno jinak, vyjádří se výsledky v hmotnostních procentech z celkového obsahu mastných kyselin ve vzorku přijatém laboratoři

4.3. **Počet platných desetinných míst**

Počet platných desetinných míst v takto vyjádřeném výsledku je určen přesností metody.

II. STANOVENÍ KYSELINY ERUKOVÉ

1. PŘEDMĚT A OBLAST POUŽITÍ

Tato metoda slouží ke stanovení obsahu kyseliny erukové:

- i) v olejích a tucích obsahujících kyselinu cetolejovou (zejména cis- izomer kyseliny dokosenové, který se vyskytuje v rybích olejích) a
- ii) v hydrogenovaných olejích a tucích obsahujících trans- a cis- izomery kyseliny dokosenové.

2. DEFINICE

„Obsahem kyseliny erukové“ se rozumí obsah kyseliny erukové stanovený popsanou metodou.

3. PODSTATA METODY

Methylestery jednotlivých mastných kyselin oleje nebo tuku se oddělí metodou nízkoteplotní tenkovrstvé argentační chromatografie a kvantitativně stanoví plynovou chromatografií s kapalnou stacionární fází.

4. REAKČNÍ ČINIDLA

- 4.1. Čerstvě destilovaný diethylether bez peroxidu
- 4.2. n-Hexan
- 4.3. Silikagel G pro chromatografii na tenké vrstvě
- 4.4. Silikagel pro kolonovou chromatografii
- 4.5. Roztok dusičnanu stříbrného 200 g/l. Ve vodě se rozpustí 24 g dusičnanu stříbrného a doplní se vodou do 120 ml.
- 4.6. Roztok methylesteru kyseliny erukové 5 mg/ml. V několika ml n-hexanu se rozpustí 50 mg methylesteru kyseliny erukové a doplní se n-hexanem do 10 ml.
- 4.7. Methylester kyseliny tetrakosanové jako vnitřní standardní roztok 0,25 mg/ml. V několika ml n-hexanu se rozpustí 25 mg methylesteru kyseliny tetrakosanové (jako v bodě 4.6.) a doplní se n-hexanem do 100 ml.
- 4.8. Vytvájecí rozpouštědlo. Toluén: n-hexan v poměru 90:10 (objemově).
- 4.9. Roztok 2,7dichlorofluoresceinu 0,5 g/l. Za současného zahřívání a míchání se rozpustí 50 mg 2,7dichlorofluoresceinu ve 100 ml padesátiprocentního vodného roztoku methanolu.

5. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- 5.1. Zařízení pro chromatografii na tenké vrstvě a dále zejména:
 - 5.1.1. Zmrazovací jednotka schopná udržet vytvájecí komoru a její obsah při teplotě od - 20 °C do - 25 °C.
 - 5.1.2. Skleněné desky 200 × 200 mm.
 - 5.1.3. UV lampa.
 - 5.1.4. Skleněné kolony o délce asi 200 mm o vnitřním průměru asi 10 mm s filtrem ze skelné vaty nebo s fritou. Případně malé nálevky s fritou.
 - 5.1.5. Aplikátor pro nanášení roztoků do úzkého pásku nebo proužku na chromatografické (TLC) desky.
- 5.2. Plynový chromatograf s kapalnou stacionární fází s elektronickým integrátorem ve smyslu oddílu III přílohy VI nařízení Komise (EHS) č. 72/77.

6. POSTUP

6.1. Příprava methylesterů mastných kyselin

Z přibližně 400 mg olejové nebo tukové složky analyzovaného vzorku se připraví roztok obsahující asi 20 až 50 mg/ml methylesterů mastných kyselin v nhexanu metodou popsanou v oddíle II bodu 3 přílohy VI nařízení Komise (EHS) č. 72/77.

6.2. Chromatografie na tenké vrstvě

6.2.1. Příprava desek

Do 500ml baňky s kulatým dnem se vsype 60 g silikagelu (4.3), přidá se 120 ml roztoku dusičnanu stříbrného (4.5) a protřepává se 1 minutu do vytvoření zcela homogenní suspenze. Tato suspenze se poté nanese obvyklým způsobem na desky. Tloušťka vrstvy musí být přibližně 0,5 mm. Toto množství suspenze je dostatečné pro přípravu pěti desek o rozměrech 200 × 200 mm.

Desky se nechají částečně vyschnout na vzduchu (nejlépe v temnu po dobu asi 30 minut). Desky se úplně vysuší a aktivují v sušárně po dobu 2 hodin a 30 minut při teplotě 100 °C. Po aktivaci se desky co nejdříve použijí nebo se přechovávají v temnu a před použitím se znovu aktivují. (Poznámka: aktivace při 110 °C po dobu 1 hodiny je dostačující, pokud přitom deska neztmavne). Před použitím se v nanesené vrstvě sorbentu vyryjí rýhy 10 mm od bočních okrajů a od horního okraje každé desky, aby se v průběhu vyvíjení snížily okrajové efekty.

6.2.2. Nanášení methylesterů

Pomocí aplikátoru (5.1.5) se nanese do úzkého, asi 50 mm dlouhého proužku, nejméně 40 mm od okraje desky a 10 mm od spodního okraje desky 50 µl roztoku methylesterů (6.1) připravených ze vzorku. Podobným způsobem se nanese 100 µl směsného roztoku obsahujícího stejné objemy připraveného roztoku methylesterů (6.1) a roztoku methylesteru kyseliny erukové (4.6). Vzhledem ke křehkosti nanesené vrstvy sorbentu se postupuje při nanášení roztoků zvláště opatrně. (Poznámka: na desku se případně může nanést také 50 µl roztoku methylesteru kyseliny erukové (4.6), který po vyvíjení pomůže při identifikaci proužku methylesteru kyseliny erukové – viz obrázek.) Po nanášení methylesterů se spodní okraj desky postaví do diethyletheru na dobu, než ether dostoupí asi 5 mm nad zónu nanesených vzorků. Takto dojde ke zkoncentrování methylesterů do úzkého proužku.

6.2.3. Vyvíjení desek

Do vyvíjecí komory se nalije vyvíjecí rozpouštědlo do výšky asi 5 mm (4.8) a komora uzavřená víčkem se uloží do zmrazovací jednotky (5.1.1) udržované při teplotě - 25°C nebo co nejbližší této teploty. (V některých případech může být vhodné vyvíjecí komoru obložit). Po dvou hodinách se deska opatrně umístí do komory a rozpouštědlo se nechá stoupat asi do jedné poloviny až dvou třetin výšky desky. Deska se vyjme a rozpouštědlo se z ní jemně odpaří v proudu dusíku. Deska se znovu vloží do komory a rozpouštědlo se ponechá stoupat až k vrchnímu okraji desky. Deska se vyjme a jako v předchozím případě se vysuší v proudu dusíku a poté se opatrně postříká roztokem 2,7dichlorofluoresceinu (4.9).

Deska se prohlédne pod ultrafialovým světlem a pruh obsahující methylester kyseliny erukové ve vzorku se lokalizuje pomocí zvýrazněného pruhu vzorku, ke kterému byl přidán methylester kyseliny erukové (viz obrázek).

6.2.4. Separace methylesterových frakcí

Proužek methylesteru kyseliny erukové pocházející ze vzorku se seškrábne do 50 ml kádinky tak, aby nedošlo ke ztrátám. Obdobně se do jiné 50 ml kádinky přenese silikagel umístěný nad a pod proužkem methylesteru kyseliny erukové. Tento pruh obsahuje všechny ostatní frakce methylesterů mastných kyselin. Do každé kádinky se přidá 1,0 ml standardního roztoku methylesteru kyseliny tetrakosanové (4.7) a 10 ml diethyletheru (4.1). Obsah kádinek se promíchá a přenese se na separační kolony či nálevky (5.1.4), z nichž každá obsahuje asi 1 g silikagelu (4.4). Methylestery se extrahují pomocí tří nebo čtyř 10 ml dávek diethyletheru. Eluáty se zachycují do malých baněk. Každý filtrát se odpaří na malý objem pomocí jemného proudu dusíku a methylestery se přelijí do malých zkumavek s kónickým dnem. Zbytek rozpouštědla se odpaří v proudu dusíku tak, aby se methylestery zkoncentrovaly na dně zkumavek. Methylestery se rozpustí v 25 až 50 µl nhexanu (4.2).

6.3. Plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází

6.3.1. Provede se postup popsáný v oddílu III přílohy VI nařízení Komise č. 72/77/EHS a analyzují se 1 až 2 µl roztoků methylesterů získaných z frakce i) obsahující methylester kyseliny erukové a z frakcí ii) obsahujících zbytek methylesterů mastných kyselin.

6.3.2. Pomocí elektronického integrátoru se stanoví tyto plochy píků:

i) z chromatogramu frakce obsahující methylester kyseliny erukové plochy píků:

- a) methylesteru kyseliny erukové [E]
- b) vnitřního standardu [L₁]
- c) celkových methylesterů s výjimkou vnitřního standardu [EF]

ii) z chromatogramu frakcí obsahujících zbytek methylesterů mastných kyselin plochy píků:

- a) celkových methylesterů mimo vnitřního standardu [RF]
- b) vnitřního standardu [L₂]

7. VYJÁDŘENÍ VÝSLEDKŮ

7.1. Postup výpočtu a vzorec

7.1.1. Obsah kyseliny erukové ve vzorku vyjádřený jako procentní podíl methylesteru kyseliny erukové z celkových methylesterů mastných kyselin připravených ze vzorku je dán vzorcem:

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

kde:

E, EF, RF, L₁ a L₂ jsou plochy píků podle 6.3.2, v případě nutnosti korigované kalibračními faktory.

Obsah methylesteru kyseliny erukové daný výše uvedeným vzorcem odpovídá obsahu kyseliny erukové vyjádřenému jako procento z celkového množství mastných kyselin ve vzorku.

7.1.2. Pokud jsou plochy píků vyjádřeny v procentech, pak lze hodnoty EF a RF vypočítat takto:

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2$$

7.1.3. Metoda výpočtu podle odstavce (7.1.1) předpokládá, že množství kyseliny tetrakosanové ve vzorku je zanedbatelné. Pokud se ukáže, že ve vzorku je významné množství této kyseliny, hodnota pro kyselinu tetrakosanovou (L₂) získaná z chromatogramu frakcí obsahujících zbylé methylestery mastných kyselin musí být snížena takto:

$$L_1 - T_2$$

kde:

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

a

T₂ = plocha píku methylesteru kyseliny tetrakosanové pocházející ze vzorku, tvořící část plochy píku vnitřního standardu v chromatogramu zbývajících frakce methylesterů mastných kyselin

P₂ = plocha píku methylesteru kyseliny palmitové z chromatogramu zbylé frakce

T₀ = plocha píku methylesteru kyseliny tetrakosanové z chromatogramu methylesterů celkových mastných kyselin stanovených analýzou podle článku 2 této směrnice

P₀ = plocha píku methylesteru kyseliny palmitové z chromatogramu methylesterů celkových mastných kyselin stanovených analýzou podle článku 2 této směrnice

7.1.4. Odvození vzorce

Podíl mastných kyselin ve frakci obsahující methylester kyseliny erukové vyjádřený jako procento z celkového obsahu mastných kyselin ve vzorku je dán vzorcem:

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

Podíl kyseliny erukové ve frakci obsahující methylester kyseliny erukové je dán vzorcem:

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

Proto je obsah kyseliny erukové ve vzorku vyjádřený jako procento z celkového obsahu mastných kyselin dán vzorcem:

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

7.1.5. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky získanými ze dvou stanovení provedených současně nebo rychle po sobě z téhož vzorku tímtež pracovníkem za totožných podmínek nesmí být větší než 10 % výsledné hodnoty nebo 0,5 g na 100 g vzorku. Rozhodující je vyšší hodnota.

OBRÁZEK

Typický chromatogram na tenké vrstvě s vyznačením oddělení methylesterů kyseliny erukové, cetolejové a trans izomerů kyseliny dokosenové

methylestery nasycených
mastných kyselin

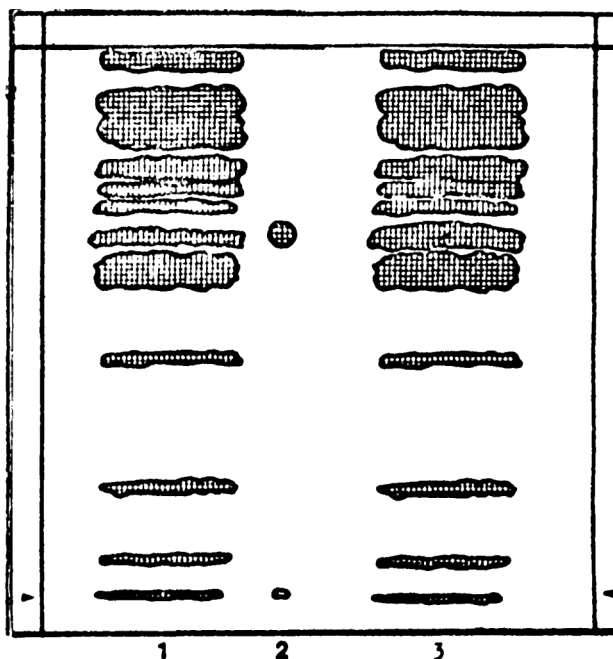
trans izomery

methylester kyseliny erukové ⁽¹⁾

methylester kyseliny cetolejové

jiné monoeny

dieny a polyeny



1. vzorek;
2. methylester kyseliny erukové;
3. vzorek + methylester kyseliny erukové.

⁽¹⁾ Frakce methylesteru kyseliny erukové obvykle obsahuje též methylestery jiných monoenových kyselin, ale neměla by obsahovat methylester kyseliny cetolejové.