

ДИРЕКТИВА НА КОМИСИЯТА

от 25 юли 1980 година

относно метода за анализ на Общността за определяне на съдържанието на ерукова киселина в маслата и мазнините, предназначени като такива за консумация от човека, и в хранителни продукти, съдържащи добавени масла или мазнини

(80/891/ЕИО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаването на Европейската икономическа общност,

като взе предвид Директива 76/621/ЕИО на Съвета от 20 юли 1976 г. относно определянето на максималното съдържание на ерукова киселина в масла и мазнини, предназначени като такива за консумация от човека, както и в храните, съдържащи добавени масла или мазнини¹, и по-специално член 3,

като има предвид, че член 2 от Директива 76/621/ЕИО постановява, че, считано от 1 юли 1979 г., съдържанието на ерукова киселина в продуктите, посочени в член 1 от тази директива, изчислени върху общото съдържание на мастни киселини в мастния компонент, не може да бъде по-голямо от 5 %;

като има предвид, че член 3 от Директива 76/621/ЕИО постановява, че съдържанието на ерукова киселина се определя посредством метода за анализ на Общността;

като има предвид, че Регламент (ЕИО) № 1470/68 на Комисията от 23 септември 1968 г. за вземането и раздробяването на проби, както и за определянето на съдържанието на масла, примеси и влага в маслодайни семена², формулира в приложение VI, както е въведено от Регламент (ЕИО) 72/77³, метод за анализ за определяне на съдържанието на ерукова киселина в репични и рапични семена; като има предвид, че този метод се използва като метод за предварителна селекция;

като има предвид, че е невъзможно, когато съставните мастни киселини на маслата и мазнините се анализират посредством газово-течна хроматография при нормални условия, еруковата киселина да бъде разграничена от другите изомери на докозеноинова киселина, като цетолеинова киселина;

като има предвид, че е необходимо да се определя нивото на еруковата киселина в масла и мазнини, а също и в хранителни продукти, към които са добавени

¹ ОВ L 202, 28. 7. 1976 г., стр. 35.

² ОВ L 239, 28. 9. 1968 г., стр. 2.

³ ОВ L 12, 15. 1. 1977 г., стр. 11.

масла и мазнини, които могат да съдържат цетолейнова киселина и други изомери на докозеноинова киселина.

като има предвид, че съдържанието на ерукова киселина не е необходимо да се определя в масла и мазнини и в хранителни продукти, към които са били добавени масла или мазнини когато, след използването на скрийнингови методи за анализ, е открито, че те не съдържат повече от 5 % общи докозеноинови киселини или цис-докозеноинови киселини;

като има предвид, че, очаквайки въвеждането на подобрен метод за анализ за определяне на ерукова киселина, в момента настоящият метод за анализ се смята за най-подходящ;

като има предвид, че мерките, предвидени в настоящата директива, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по храните,

ПРИЕ НАСТОЯЩАТА ДИРЕКТИВА:

Член 1

Държавите-членки изискват анализа, необходим за определяне на съдържанието на ерукова киселина в продуктите, посочени в член 1 от Директива 76/621/ЕИО, да се провежда съгласно член 2.

Член 2

1. За целите на скрийнинга, се определя един от изброените показатели:
2. Ако общото съдържание
 - а) на докозеноева киселина в продуктите, посочени в член 1, като се използва методът, посочен в приложение VI към Регламент (ЕИО) 1470/68 или
 - б) общото съдържание на цис-докозениновата киселина в продуктите, посочени в член 1, посредством метода, описан в приложение VI към Регламент (ЕИО) № 1470/68, като се използва газово-течна хроматография, в условия, при които цис- и транс-изомерите на докозеноиновата киселина са разделени; подходящи за тази цел стационарни фази, са например, цианопропилполисилоксани или течни кристали.
3. Ако общото съдържание на всяко от веществата:
 - а) докозеноеви киселини, съгласно параграф 1, а) или
 - б) цис-докозеноинове киселини съгласно параграф 1, б),в продуктите, посочени в член 1, изчислено върху тяхното общо съдържание на мастни киселини в мастния компонент, не превишава 5 %, не се изисква по-нататъшно определяне. В противен случай съдържанието на ерукова

киселина се определя посредством метода, описан в приложението към настоящата директива.

Член 3

Държавите-членки приемат необходимите закони, подзаконови и административни разпоредби за спазване на настоящата директива най-късно до 1 февруари 1982 г. Те незабавно уведомяват Комисията за това.

Член 4

Адресати на настоящата директива са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 25 юли 1980 година.

За Комисията
Etienne DAVIGNON
Член на Комисията

ОПРЕДЕЛЯНЕ СЪДЪРЖАНИЕТО НА ЕРУКОВА КИСЕЛИНА В МАСЛА И МАЗНИНИ, ПРЕДНАЗНАЧЕНИ КАТО ТАКИВА ЗА КОНСУМАЦИЯ ОТ ЧОВЕКА, ИЛИ КАТО МАСТЕН ИЛИ МАСЛЕН КОМПОНЕНТ НА ХРАНИТЕЛНИ ПРОДУКТИ, КЪМ КОИТО СА БИЛИ ДОБАВЕНИ МАСЛА ИЛИ МАЗНИНИ

I. ВЪВЕДЕНИЕ

1. ПРИГОТВЯНЕ НА ПРОБИТЕ

1.1. Общи данни

Масата на пробата, представена в лабораторията за анализ, обикновено е 50 г, освен ако не се изисква по-голямо количество.

1.2. Приготвяне на пробата за анализ в лабораторията

Преди да бъде анализирана, пробата трябва да бъде хомогенизирана.

1.3. Контейнери

Така приготвената проба се съхранява в непропускащ въздух и влага контейнер.

2. РЕАКТИВИ

2.1. Вода

2.1.1. Когато се изисква вода като разтворител, разредител или за измиване, се използва дестилирана вода или деминерализирана вода с поне еквивалентна чистота.

2.1.2. Където се упоменава „разтвор” или „разреждане”, без да се посочва някакъв друг реактив, се имат предвид воден разтвор или разреждане с вода.

2.2. Химикали

Всички реактиви трябва да са с аналитична чистота, освен ако не е посочено нещо друго.

3. АПАРАТУРА

3.1. Списък на апаратурата

Този списък съдържа само специализирано оборудване и такова по спецификация.

3.2. Аналитична везна

„Аналитична везна” означава везна с чувствителност 0,1 мг или по-висока.

4. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

4.1. Резултати

Резултатът, посочен в официалния доклад за анализа, представлява средната стойност, получена от най-малко от две определяния със задоволителна повторяемост.

4.2. Изчисляване на процента

Освен ако не е посочено друго, резултатите се изразяват като проценти (маса/маса) от общите мастни киселини в пробата, както е получена в лабораторията.

4.3. Брой на значещите цифри

Резултатът не трябва да съдържа повече значещи цифри отколкото позволява точността на метода.

II. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЕРУКОВАТА КИСЕЛИНА

1. ОБХВАТ И СФЕРА НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Методът определя съдържанието на ерукова киселина в:

- i) масла и мазнини, съдържащи цетолеинова киселина (определен цис-изомер на докозеноинова киселина, който се среща в рибните масла), и
- ii) хидрогенирани масла и мазнини, съдържащи trans- и cis-изомери на декозеноева киселина.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Съдържание на ерукова киселина: съдържанието на ерукова киселина, както е определено посредством описания метод.

3. ПРИНЦИП

Разделяне на метиловите естери на мастните киселини на маслото или мазнината посредством нискотемпературна тънкослойна хроматография със обработен със сребърен нитрат абсорбент и количествено разделяне на така разделените от течната газ-хроматография.

4. РЕАКТИВИ

- 4.1. Прясно дестилиран диетилов етер без пероксид.
- 4.2. n-хексан.

- 4.3. Силикагел G, за тънкослойна хроматография.
- 4.4. Силикагел, за колонна хроматография.
- 4.5. Разтвор на сребърен нитрат, 200 г/л. Разтварят се 24 г сребърен нитрат във вода и се долива вода до 120 мл.
- 4.6. Разтвор на метилов ерукат 5 мг/мл. Разтваря се 50 мг метилов ерукат в няколко ml п-хексан и се разрежда до 10 мл с п-хексан.
- 4.7. Метилов тетракозаноат, вътрешен стандартен разтвор, 0,25 мг/мл. Разтварят се 25 mg метилов тетракозаноат в няколко мл п-хексан (например 4-6) и се разрежда до 100 мл с п-хексан.
- 4.8. Разтворител за проявяване: толуен: п-хексан 90:10 (об/об).
- 4.9. 2,7-Дихлорофлуоресцеинов разтвор 0,5 г/л. Разтваря се чрез затопляне и разбъркване 50 мг 2,7-дихлорофлуоресцеин в 100 мл 50 % воден разтвор на метанол.

5. АПАРАТУРА

- 5.1. Апаратурата за тънкослойна хроматография, която да включва, по-специално:
 - 5.1.1. Устройство за дълбоко замразяване, способно да поддържа температура минус 20 °C до минус 25°C на съда за проявяване и на съдържанието му.
 - 5.1.2. Стъклени плочки 200 x 200 .
 - 5.1.3. Ултравиолетова лампа.
 - 5.1.4. Стъклени колони, с дължина около 200 мм, вътрешен диаметър около 10 мм, с филтър от стъклена вата или синтеровано стъкло. Алтернативно, малки фунии с филтри от синтеровано стъкло.
 - 5.1.5. Апликатор, за поставяне на разтворите под формата на тясна лента или линия върху плочките за тънкослойна хроматография.
- 5.2. Газово-течен хроматограф, заедно с електронен интегратор, както е описано в раздел III на Приложение VI към Регламент (ЕИО) № 72/77 на Комисията.

6. ПРОЦЕДУРА

6.1. Приготвяне на метилови естери на мастни киселини

Вземат се около 400 мг от масления или мастния компонент на пробата за анализ и се приготвя разтвор, съдържащ около 20 до 50 мг/мл метилови естери на мастните киселини в п-хексан посредством метода, описан в раздел II.3 от приложение VI към Регламент (ЕИО) № 72/77 на Комисията.

6.2. Тънкослойна хроматография

6.2.1. Приготвяне на плаките

Поставят се 60 г силикагел (4.3) в 500 мл колба с обло дъно, добавят се 120 мл разтвор на сребърен нитрат (4.5) и се разклаща в продължение на една минута, за да се получи напълно хомогенна рядка каша. Кашата се разстила върху плаките по обичайния начин; дебелината на слоя трябва да бъде приблизително 0,5 мм. Това количество каша е достатъчно за приготвяне на пет плаки 200 x 200 мм.

Плаките се оставят частично да изсъхнат на въздух (за предпочитане на тъмно за около 30 минути) и след това се изсушават напълно и се активират във фурна при 100°C за 2 часа и 30 минути. Плаките трябва да се използват колкото може по-бързо след активирането или се съхраняват грижливо в тъмен шкаф и после се активират отново преди употреба. (Забележка: активирането при 110°C за един час може да се приеме за задоволително, при условие, че в резултат от него плаките не са потъмнели.) За да се намали ефекта на ръбовете по време на проявяването, се нанасят линии през субстрата на 10 мм от страните и горния ръб на всяка плака.

6.2.2. *Нанасяне на метиловите естери*

Като се използва апликатора (5.1.5), се нанасят 50 мкл разтвор на метилови естери (6.1), приготвен от пробата, под формата на тънка черта с дължина около 50 мм, на най-малко 40 мм от страничния ръб и на 10 мм от долния ръб на плочката. Нанася се по подобен начин 100 мкл разтвор, съдържащ равни обеми от приготвения разтвор на метилови естери (6.1) и разтвора на метилов ерукат (4.6). Особено се внимава при нанасянето на разтворите, поради крехкостта на обвивката. (отбележете: ако желаете, 50 мкл от разтвора на метилов ерукат (4.6) могат да бъдат нанесени върху плочката, за да подпомогне идентифицирането на лентата на метиловия ерукат след проявяването: виж фигурата). След нанасянето на метиловите естери, долната част на плаката може да се постави в диетилов етер докато етерът се изкачи до около 5 мм над участъка, където е нанесена пробата. По този начин метиловите естери се концентрират в тясна лента.

6.2.3. *Проявяване на плочките*

В съда се излива достатъчно количество разтвор за проявяване (4.8) до дълбочина около 5 мм и комплектования с капак съд се поставя в шкаф за дълбоко замразяване (5.1.1) при температура минус 25°C или колкото е възможно по-близо до тази температура. (В някои случаи може да е полезно съдът да бъде изолиран). След два часа, плаката се поставя внимателно в съда и разтворителя се оставя да се изкачи до около половината до две трети от височината на плаката. Плаката се изважда и внимателно разтворителят се изпарява от нея с помощта на азотна пара. Плаката се връща в съда и разтворителят се оставя да се изкачи до горния ръб на плаката. Плаката се изважда и, както преди, се изсушава на азотна пара и после внимателно я се напръсква с разтвор на 2,7-дихлорофлуоресцеин (4.9).

Плаката се разглежда под ултравиолетова светлина и се определя мястото на съдържащата метилов ерукат лента в пробата като се използва наситената лента, към която е бил добавен метилов ерукат (виж фигурата).

6.2.4. *Разделяне на фракциите на метиловите естери*

Получената от пробата лента на метиловия естер се изстъртва в 50 мл мензура, като се внимава, за да се избегнат загубите. По същия начин силикагела, намиращ се над и под лентата метилов ерукат, се прехвърля в друга 50 мл мензура. Тази лента ще съдържа всички други фракции на

метилови естери на мастни киселини. Добавят се по 1,0 мл от стандартния разтвор на метилов тетракозаноат (4.7) и по 10 мл диетилов етер (4.1) към всяка мензура. Съдържанието се разбърква и се прехвърля в мензурите в отделни колони или фунии (5.1.4), всяка от които съдържаща около 1г силикагел (4.4); отмийте метиловите естери като използвате три до четири 10 мл порции диетилов етер. Филтратите се събират в малки колби. Всеки филтрат се изпарява до малък обем, като се използва лека азотна пара и метиловите естери се прехвърлят в малки стъклени епруветки с остро дъно. Целият разтворител се отстранява чрез изпаряване с азотна пара по такъв начин, че метиловите естери да се концентрират на дъното на епруветките. Метиловите естери се разтварят в около 25 до 50 мкл n-хексан (4.2).

6.3. Газово-течна хроматография

6.3.1. Извършва се процедурата, описана в раздел III на приложение VI към Регламент на 72/77/ЕИО на Комисията и се анализират 1 до 2 мкл от разтворите на метилови естери, получени от (i) фракцията, съдържаща метилов ерукат, и (ii) фракциите, съдържащи остатъка от метилираните мастни киселини.

6.3.2. Получените от електронния интегратор площ на пиковите са, както следва:

(i) от хроматограмата на фракцията, съдържаща метиловия ерукат:

а) метилов ерукат [E]

б) вътрешен стандарт [L₁]

в) сумата от площите на пиковите на метиловите естери, като се изключи вътрешният стандарт [EF]

(ii) от хроматограмата на фракциите, съдържащи остатъка от метиловите естери на мастни киселини

а) сумата от площите на пиковите на метиловите естери, като се изключи вътрешният стандарт [RF]

б) вътрешният стандарт [L₂]

7. ИЗРАЗЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

7.1. Метод за изчисляване и формула

7.1.1. Съдържанието на ерукова киселина в пробата, определено като нейния метилов естер, като процент от общите метилови естери на мастни киселини, приготвени от пробата, се получава от:

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

където

E, EF, RF, L₁ и L₂ са площите на пиковите, посочени в 6.3.2, коригирани, ако е необходимо, като се използват калибровъчни коефициенти.

За практически цели, стойността на метиловия ерукат, получена от горната формула, е еквивалентна на нивото на еруковата киселина, изразено като процент от общото ниво на мастните киселини в пробата.

7.1.2. Ако площите на пиковите са получени в проценти, стойностите на EF и RF могат да бъдат изчислени, както следва:

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2$$

7.1.3. Методът за изчисляване (7.1.1) приема, че нивото на тетракозенова киселина в пробата е незначително. Ако се окаже наличие на значителни количества от тази киселина, стойността на тетракозеновата киселина (L₂), получена от хроматограмата на фракциите, съдържащи остатъка от метиловите естери на мастни киселини, трябва да бъде сведена до:

$$L_2 - T_2,$$

където

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

и

T₂ = площта на пика на метиловия тетракозеноат, получен от пробата, който образува част от площта на пика, дължаща се на вътрешния стандарт в хроматограмата на оставащата фракция на метилови естери на мастни киселини

P₂ = площта на пика на метилов палмитат, получен от хроматограмата на оставащата фракция

T₀ = площта на пика на метилов тетракозеноат, получен от хроматограмата на метиловите естери на общите мастни киселини, както е определен посредством анализа, посочен в член 2 от настоящата директива

P₀ = площта на пика на метилов палмитат, получен от хроматограмата на метиловите естери на общите мастни киселини, както е определен посредством анализа, посочен в член 2 от настоящата директива.

7.1.4. *Извеждане на формулата*

Пропорцията на мастни киселини във фракцията, съдържаща метиловия ерукат, изразена като процент от общите мастни киселини в пробата, се получава от:

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

Пропорцията на ерукова киселина във фракцията, съдържаща метиловия ерукат, се получава от:

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

Следователно, съдържането на ерукова киселина в пробата, изразено като процент от общите мастни киселини, се получава от:

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

7.1.5. Повторяемост

Разликата между стойностите на две определяния, когато са извършени едновременно или в бърза последователност, върху една и съща проба, от един и същи лаборант, при едни и същи условия, не трябва да превишава 10 % от резултата или 0,5 г на 100 г проба, като се взема по-голямата стойност.

ФИГУРА

Типична тънкослойна хроматограма, показваща разделянето на метиловите естери от еруковата киселина, цетолеиновата киселина и транс-изомерите на докозеноиновата киселина

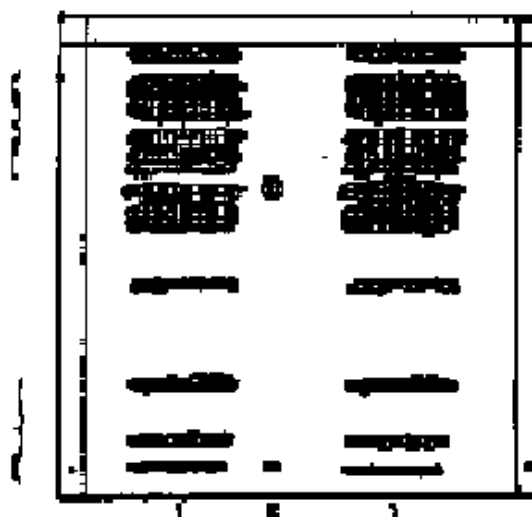
Метиллови естери на наситени
мастни киселини

транс-изомери

Метиллов ерукат⁴
Метиллов цетолеат

Други моноени

Диени и полиени



1 – проба

2- метилов ерукат

3 – проба+метилов ерукат

⁴ Фракцията, обозначена като метилов ерукат, обикновено съдържа метиллови естери на други моноеноеви киселини, но не съдържа метилов цетолеат.