

TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR

frá 25. júlí 1980

um greiningaraðferð innan bandalagsins á magni erucic-sýru í olíu og fitu til manneldis og matvælum sem innihalda viðbætta olíu eða fitu

(80/891/EBE)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Efnahagsbandalags Evrópu,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 76/621/EBE frá 20. júlí 1976 um mesta leyfilegt magn af erucic-sýru í olíu og fitu sem ætluð er til manneldis og matvælum sem innihalda viðbætta olíu eða fitu ⁽¹⁾, einkum 3. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

Í 2. gr. tilskipunar 76/621/EBE er kveðið á um að frá 1. júlí 1979 megi vörurnar, sem um getur í 1. gr. þeirrar tilskipunar, ekki innihalda meira en 5% af erucic-sýru, reiknað út frá heildarmagni fitusýra í fitufasanum.

Í 3. gr. tilskipunar 76/621/EBE er kveðið á um að magn erucic-sýru skuli ákvarðað með greiningaraðferð bandalagsins.

Í VI. viðauka við reglugerð (EBE) nr. 1470/68 frá 23. september 1968 um töku og smækkun sýna og ákvörðun á innihaldi olíu, óhreinindum og raka í olíufræjum ⁽²⁾ er mælt fyrir um, eins og kemur fram í reglugerð (EBE) nr. 72/77 ⁽³⁾, greiningaraðferð til að ákvarða magn erucic-sýru í kolsa- og repjufræjum. Því ber að nota þessa aðferð til skimunar.

Þegar fitusýruþáttur olíu- og fitu er greindur með gasgreini er ekki unnt við eðlilegar aðstæður að greina á milli erucic-sýru og annarra ísomera af dókósensýru, t.d. setólínsýru.

Nauðsynlegt er að ákvarða magn erucic-sýru í olíu og fitu, svo og í matvælum með viðbættri olíu eða fitu sem kann að innihalda setólínsýru og aðra ísomera af dókósensýru.

Ekki þarf að ákvarða magn erucic-sýru í olíu, fitu og matvælum með viðbættri olíu eða fitu og komið hefur fram við

skimun að innihaldi ekki meira en 5% alls af dókósensýrum eða af cis-dókósensýrum.

Þar til nákvæmari greiningaraðferð hefur verið komið á til að ákvarða erucic-sýru er þessi greiningaraðferð talin sú sem best hentar sem stendur.

Þær ráðstafanir sem kveðið er á um í þessari tilskipun eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um matvæli.

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

1. gr.

Aðildarríkin skulu krefjast þess að nauðsynlegar greiningar til að ákvarða magn erucic-sýru í þeim vörum sem um getur í 1. gr. tilskipunar 76/621/EBE séu framkvæmdar eins og mælt er fyrir um í 2. gr.

2. gr.

1. Við skimun skal ákvarða eftirfarandi:

- a) heildarmagn dókósensýru í vörunum sem um getur í 1. gr. með aðferðinni í VI. viðauka við reglugerð (EBE) nr. 1470/68; eða
- b) heildarmagn cis-dókósensýru í vörunum sem um getur í 1. gr. með aðferðinni í VI. viðauka við reglugerð (EBE) nr. 1470/68 með því að nota gasgreini við þær aðstæður að cis- og trans-ísómerar af dókósensýrum séu aðskildir; stöðugir fasar sem henta til þessa eru t.d. sýanóprópýlpólýsiloxanar eða vökvakristallar.

2. Ef heildarmagn annaðhvort:

- a) dókósensýru, sem ákvörðuð er samkvæmt a-lið 1. mgr., eða
- b) cis-dókósensýru, sem ákvörðuð er samkvæmt b-lið 1. mgr.,

⁽¹⁾ Stjtið. EB nr. L 202, 28. 7. 1976, bls. 35.⁽²⁾ Stjtið. EB nr. L 239, 28. 9. 1968, bls. 2.⁽³⁾ Stjtið. EB nr. L 12, 15. 1. 1977, bls. 11.

í vörunum sem um getur í 1. gr., reiknað út frá heildarmagni fitusýra í fitufasanum, er ekki meira en 5% skal ekki krafist frekari ákvarðana. Annars skal magn erucic-sýru ákvarðað með aðferðinni sem er sett fram í viðaukanum.

3. gr.

Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórn-sýslufyrirmæli til að fara að tilskipun þessari eigi síðar en 1. febrúar 1982. Þau skulu tilkynna það framkvæmdastjórn-inni þegar í stað.

4. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 25. júlí 1980.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Étienne DAVIGNON

framkvæmdastjóri.

VIÐAUKI

**ÁKVÖRÐUN Á MAGNI ERUCIC-SÝRU Í OLÍU OG FITU SEM ÆTLUÐ
ER TIL NEYSLU ÁN FREKARI VINNSLU OG Í MATVÆLUM MEÐ VIÐ-
BÆTTRI OLÍU EÐA FITU****I. INNGANGUR**

1. **SÝNI UNDIRBÚIÐ**
 - 1.1. **Almennt**

Massi sýnisins sem rannsóknarstofan fær til greiningar skal að öllu jöfnu vera 50 g nema þörf sé á stærra sýni.
 - 1.2. **Sýnið undirbúið til greiningar á rannsóknarstofu**

Sýnið skal gert einsleitt fyrir greiningu.
 - 1.3. **Ílát**

Sýni sem þannig er undirbúið skal geymt í loft- og rakapétta íláti.
2. **HVARFEFNI**
 - 2.1. **Vatn**
 - 2.1.1. Þegar vatn er notað til að leysa, þynna og þvo með skal notast við eimað vatn eða steinefnasneytt vatn sem er að minnsta kosti jafnhreint og eimað vatn.
 - 2.1.2. Þegar minnst er á „lausn“ eða „þynningu“ án þess að annað hvarfefni sé tilgreint er átt við lausn í vatni eða þynningu með vatni.
 - 2.2. **Kemísk efni**

Öll efni sem eru notuð skulu vera með viðurkenndum greiningarhreinleika nema annað sé tekið fram.
3. **BÚNAÐUR**
 - 3.1. **Skrá yfir búnað**

Við upptalningu tækja eru aðeins nefnd sértæki til sértækrar notkunar.
 - 3.2. **Fínvog**

Með „fínvog“ er átt við vog sem getur að minnsta kosti mælt með 0,1 mg nákvæmni.
4. **FRAMSETNING NIÐURSTAÐNA**
 - 4.1. **Niðurstöður**

Niðurstaðan í hinni opinberu greiningarskýrslu skal vera meðalgildi minnst tveggja ákvarðana sem unnt er að endurtaka á viðunandi hátt.
 - 4.2. **Prósentureikningur**

Nema mælt sé fyrir um annað skulu niðurstöður settar fram sem hundraðshluti (m/m) heildarmagns fitusýr-anna í sýninu eins og rannsóknarstofan fær það í hendur.
 - 4.3. **Fjöldi marktækra tölustafa**

Marktækir stafir í niðurstöðunum skulu ekki vera fleiri en nákvæmni greiningaraðferðarinnar leyfir.

II. ÁKVÖRDUN Á ERUCIC-SÝRU

1. UMFANG OG GILDISSVIÐ

Með þessari aðferð er unnt að ákvarða magn erucic-sýru:

- i) í olíu og fitu sem inniheldur setólínsýru (einkum cis-ísómera af dókósensýru sem er að finna í fiskolíu), og
- ii) í hertri olíu og fitu sem inniheldur trans- og cis-ísómera af dókósensýru.

2. SKILGREINING

Magn erucic-sýru: innihald af erucic-sýru eins og það er ákvarðað með tilgreindri aðferð.

3. MEGINREGLA

Metýlesterar af fitusýruþáttum í olíu- og fitu eru sundurgreindir með skiljun við lágt hitastig og á þunnu lagi sem er virkjað með silfurnítrati og ákvarðaðir magnbundið með gasgreini.

4. HVARFEFNI

- 4.1. Nýeimaður díetýleter án peroxíðs.
- 4.2. n-hexan.
- 4.3. Kísilhlaup G, fyrir þunnlagsskiljun.
- 4.4. Kísilhlaup, sem súluefni fyrir gasgreini.
- 4.5. Silfurnítratlausn, 200 g/lítra. 24 g af silfurnítrati eru leyst upp í vatni og fyllt að 120 ml með vatni.
- 4.6. Metýlerukatlausn 5 mg/ml. 50 mg metýlerukat er leyst upp í nokkrum ml af n-hexani og þynnt að 10 ml með n-hexani.
- 4.7. Metýltetrakósanóat, innri staðallausn, 0,25 mg/ml. 25 mg metýltetrakósanóat er leyst upp í nokkrum ml af n-hexani (eins og í 4.6) og þynnt að 100 ml með n-hexani.
- 4.8. Framköllunarlausn. Tólúen: n-hexan 90 : 10 (v/v).
- 4.9. 2,7 díklóróflúorsínlausn, 0,5 g/lítra. Leyst með upphitun og með því að hræra 50 mg af 2,7 díklóróflúorsíni í 100 ml af 50% metanólvatnslausn.

5. BÚNAÐUR

- 5.1. Búnaður fyrir þunnlagsskiljun:
 - 5.1.1. Frystiskápur sem er þannig gerður að unnt sé að halda framköllunarfláti og innihaldi þess við mínus 20°C til mínus 25°C.
 - 5.1.2. Glerplötur, 200 × 200 mm.
 - 5.1.3. Lampi með útfjólubláu ljósi.
 - 5.1.4. Glersúlur, um það bil 200 mm að lengd, og um það bil 10 mm að innra þvermáli, með síu úr glerull eða hertu gleri, eða litlar trektir með hertu glervatti.
 - 5.1.5. Tæki til að bera lausnir á þunnar plötur sem mjóa línu eða streng.
- 5.2. Gasgreinir ásamt búnaði sem vinnur úr niðurstöðunum („electronic integrator“), eins og lýst er í III. þætti í VI. viðauka við reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EBE) nr. 72/77.

6. VINNUAÐFERÐ

6.1. Undirbúningur á metýlesterum fitusýra

Tekið er um það bil 400 mg sýni af olíu eða fitu til greiningar og lausn undirbúin, sem í eru um það bil 20 til 50 mg/ml af metýlesterum fitusýra í n-hexani, með aðferðinni sem lýst er í 3. lið II. þáttar í VI. viðauka við reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EBE) nr. 72/77.

6.2. Þunnlagsskiljun

6.2.1. Undirbúningur á plötum

60 g af kísilhlaupi (4.3) eru sett í 500 ml kolbu með kúlulaga botni, 120 ml af silfurnítratlausn (4.5) bætt út í og hrist í eina mínútu til að ná fram fullkomlega einsleitri grugglausn. Grugglausninni er smurt á vanalegan hátt á plötunna þannig að þykkt lagsins sé um það bil 0,5 mm. Þetta magn af grugglausn nægir fyrir fimm 200×200 mm plötur.

Plötunna eru loftþurrkaðar að hluta (helst með því að láta þær standa á dimmum stað í 30 mínútur). Plötunna eru síðan fullþurrkaðar og virkjaðar með því að láta þær standa í ofni í tvær klukkustundir og þrjátíu mínútur við 100°C . Þegar plötunna hafa verið virkjaðar skal nota þær eins fljótt og unnt er eða komið varlega fyrir í dimmum skáp og síðan endurvirkjaðar fyrir notkun. (Athugasemd: virkjun við 110°C í eina klukkustund kann að vera nægileg svo fremi sem plötunna svertist ekki.) Línur eru dregnar gegnum lagið 10 mm frá hliðunum og efri hluta hvorrar plötur fyrir notkun til að draga úr kantáhrifum við framköllun.

6.2.2. Metýlesterar bornir á

Með tækinu sem lýst er í 5.1.5 eru 50 μl af metýlesteralausn (6.1) úr undirbúna sýninu bornir á í mjórri línu sem er um það bil 50 mm löng og að minnsta kosti 40 mm frá hliðum plötunnar og 10 mm frá neðri enda hennar. Síðan eru 100 μl af lausninni, sem inniheldur jafnmikið af undirbúna lausninni af metýlesterum (6.1) og metýlerukatlausninni (4.6), bornir á á svipaðan hátt. Þegar blandan er borin á verður að gæta ítrustu varfærni því lagið er mjög viðkvæmt. (Athugasemd: ef þess er óskað má bera 50 μl af metýlerukatlausninni (4.6) á plötuna til að auðveldara sé að bera kennsl á metýlerukatlínuna eftir framköllunina: sjá mynd). Eftir að metýlesterarnir hafa verið bornir á má láta neðri enda plötunnar standa í díetýleter þar til eterinn nær um það bil 5 mm upp á svæðið þar sem sýnið var borið á. Þannig er metýlesterunum þjappað saman í mjóa línu.

6.2.3. Framköllun á plötunum

Framköllunarlausninni (4.8) er hellt í flát þar til 5 mm dýpt næst, síðan er flátið með lokinu á sett í frystiskápinn (5.1.1) og geymt þar við mínus 25°C eða eins nálægt því stigi og unnt er. (Í sumum tilvikum kann að vera til bóta að breiða stykki yfir flátið.) Eftir tvær klukkustundir er platan sett varlega í flátið og lausnin látin stíga þar til hún nær helmingnum eða tveimur þriðju af hæð plötunnar. Platan er fjarlægð og lausnin látin gufa hægt upp af henni við köfnunarefnisblástur. Síðan er platan sett aftur í flátið og lausnin látin stíga upp að efri brún plötunnar. Platan er fjarlægð aftur og lausnin látin gufa hægt upp af henni við köfnunarefnisblástur eins og áður og síðan er úðað varlega með 2,7 díklóróflúórsínlausninni(4.9).

Þegar platan er skoðuð í útfjólubláu ljósi er unnt að staðsetja línuna með metýlerukatínu í sýninu með því að bera það saman við styrktu línuna í sýninu sem metýlerukati var bætt út í (sjá mynd).

6.2.4. Sundurgreining á metýlesterafleiðum

Metýlerukatlínun úr sýninu er skröpuð af í 50 ml bikarglas og þess gætt að ekkert tapist. Kísilhlaupið sem er á og undir metýlerukatlínunni er skrapað af á sama hátt í annað 50 ml bikarglas. Þessi lína inniheldur allar aðrar afleiður af metýlesterum fitusýranna. 1,0 ml af metýltetrakósanóatstaðallaun (4.7) og 10 ml af díetýleteri (4.1) er bætt út í hvort bikarglas. Hrært er í og innihald bikarglasanna fært yfir í aðskildar súlur eða síur (5.1.4) sem hver um sig inniheldur um það bil 1 g af kísilhlaupi (4.4) og metýlesterarnir skolaðir með því að nota þrjá eða fjóra 10 ml skammta af díetýleter. Síða vökvanum er safnað í litlar kolbur. Síði vökvinn látinn gufa upp við köfnunarefnisblástur þar til rúmmál hans hefur minnkað til muna og metýlesterarnir færðir yfir í litlar niðurmjóar glerpípur. Öll lausnin látin gufa upp við köfnunarefnisblástur þannig að metýlesterarnir þjappast saman á botni pípanna. Metýlesterarnir eru leystir upp í um það bil 25 til 50 μl af n-hexani (4.2).

6.3. Gasgreinir

6.3.1. Vinnuaðferðin sem lýst er í III. þætti VI. viðauka við reglugerð framkvæmdastjórnarinnar 72/77/EBE er notuð og 1 til 2 μ l af metýlesteralausnunum, sem fengnar eru úr i) afleiðunni sem inniheldur metýlerukat og ii) afleiðunum sem innihalda leifarnar af metýluðu fitusýrunum, eru teknir til greiningar.

6.3.2. Með sérstökum búnaði („electronic integrator“) fást eftirfarandi toppflatarmál:

- i) á grafi afleiðunnar sem inniheldur metýlerukat:
 - a) metýlerukat [E]
 - b) innri staðall [L1]
 - c) heildarflatarmál metýlestertoppisins fyrir utan innri staðallinn [EF]
- ii) á grafi afleiðanna sem innihalda leifarnar af metýlesterum fitusýranna:
 - a) heildarflatarmál metýlestertoppisins fyrir utan innri staðallinn [RF]
 - b) innri staðall [L2].

7. FRAMSETNING NIÐURSTAÐNA

7.1. Reikniaðferð og formúla

7.1.1. Innihald af erucic-sýru í sýninu, gefið upp sem metýlester í hundradshlutum af heildarmagni metýlestera af fitusýrum í sýninu, er jafnt og:

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

þar sem E, EF, RF, L_1 og L_2 eru toppflatarmálin sem um getur í 6.3.2, leiðrétt ef þörf er á með því að nota kvörðunarstuðul.

Innihaldið af metýlerukati sem fæst með formúlunni hér að framan er jafnt innihaldinu af erukatsýru sem er gefið upp sem hundradshluti af heildarinnihaldi fitusýra í sýninu.

7.1.2. Ef toppflatarmálin eru gefin upp í hundradshlutum reiknast gildin EF og RF á eftirfarandi hátt:

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2$$

7.1.3. Í reikniaðferðinni (7.1.1) er gert ráð fyrir að magnið af tetrakósansýru í sýninu sé hverfandi. Ef tiltekið magn af þessari sýru fyrirfinnst er unnt að lækka gildið fyrir tetrakósansýru L_2 í grafinu yfir afleiðurnar sem innihalda leifar af metýlesterum fitusýra í:

$$L_2 - T_2$$

þar sem

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

og

T_2 = toppflatarmál af metýltetrakósanóati úr sýninu og myndar hluta af toppflatarmálinu sem heyrir til innri staðals í grafinu af afleiðunum sem eftir eru af fitusýrumetýlesterum.

P_2 = toppflatarmál af metýlpalmítati í grafinu af afleiðunum sem eftir eru.

T_0 = toppflatarmál af metýltetrakósanóati í grafinu yfir metýlestera af heildarmagni fitusýra eins og það er ákvarðað með greiningunni sem um getur í 2. gr. þessarar tilskipunar.

P_0 = toppflatarmál af metýlpalmítati í grafinu yfir metýlestera af heildarmagni fitusýra eins og það er ákvarðað með greiningunni sem um getur í 2. gr. þessarar tilskipunar.

7.1.4. Afleiða af formúlu

Hlutfallið af fitusýrum í afleiðunni sem inniheldur metýlerukat, gefið upp sem hundradshluti af heildarmagni fitusýra í sýninu, er jafnt og:

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

Hlutfallið af erucic-sýru í afleiðunni sem inniheldur metýlerukat er jafnt og:

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

Þar af er innihald af erucic-sýru í sýninu, gefið upp sem hlutfall af heildarmagni fitusýra, jafnt og:

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

7.1.5. Endurtekingarhæfni

Munur á niðurstöðum tveggja ákvarðana sem gerðar eru á sama sýni samtímis, eða án þess að hlé verði á milli, af sama greinanda og við sams konar skilyrði, má ekki vera meiri en 10% af niðurstöðunni, eða 0,5 g í hverjum 100 g sýnis, sé stærra gildið tekið.

MYND

Dæmigert þunnlagsgraf þar sem sést sundurgreining metýlestera af erucic-sýru, setólínsýru og trans-ísómera af dókósensýru

metýlesterar mettaðrar fitusýru	{		
trans-ísómerar			
metýlerukat ⁽¹⁾			
metýlsetóleat			
aðrir mónómerar			
tvíliður og fjölíliður	{		
			1 2 3

1 sýni;
2 metýlerukat;
3 sýni + metýlerukat

⁽¹⁾ Afleiðan, ákvörðuð sem metýlerukat, inniheldur vanalega metýlestera af öðrum mónóensýrum en á að vera laus við metýlsetóleat.