

663

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI¹⁾

z dnia 15 kwietnia 2004 r.

w sprawie metody analizy zawartości kwasu erukowego w niektórych artykułach rolno-spożywczych²⁾

Na podstawie art. 34 pkt 2 ustawy z dnia 21 grudnia 2000 r. o jakości handlowej artykułów rolno-spo-

żywczych (Dz. U. z 2001 r. Nr 5, poz. 44, z późn. zm.³⁾) zarządza się, co następuje:

¹⁾ Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi kieruje działem administracji rządowej — rynki rolne, na podstawie § 1 ust. 2 pkt 3 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 29 marca 2002 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Dz. U. Nr 32, poz. 305).

²⁾ Przepisy niniejszego rozporządzenia częściowo wdrażają Dyrektywę Komisji 80/891/EWG z dnia 25 lipca 1980 r. odnoszącą się do wspólnotowej metody analizy w celu określania zawartości kwasu erukowego w olejach i tłuszczach przeznaczonych do spożycia przez ludzi oraz w środkach spożywczych zawierających dodatek olejów i tłuszczów. Dane dotyczące ogłoszenia aktów prawa Unii Europejskiej, zamieszczone w niniejszym rozporządzeniu, z dniem uzyskania przez Rzeczpospolitą Polską członkostwa w Unii Europejskiej, dotyczą ogłoszenia tych aktów w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej — wydanie specjalne.

§ 1. Metodę analizy zawartości kwasu erukowego w olejach i tłuszczach przeznaczonych do spożycia oraz w składnikach tłuszczowych lub olejowych artykułów rolno-spożywczych, określa się w załączniku do rozporządzenia.

§ 2. Rozporządzenie wchodzi w życie z dniem uzyskania przez Rzeczpospolitą Polską członkostwa w Unii Europejskiej.

Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi: *W. Olejniczak*

³⁾ Zmiany wymienionej ustawy zostały ogłoszone w Dz. U. z 2001 r. Nr 154, poz. 1802, z 2002 r. Nr 135, poz. 1145 i Nr 166, poz. 1360, z 2003 r. Nr 208, poz. 2020 i Nr 223, poz. 2220 i 2221 oraz z 2004 r. Nr 42, poz. 386.

Załącznik do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 15 kwietnia 2004 r. (poz. 663)

METODA ANALIZY ZAWARTOŚCI KWASU ERUKOWEGO W OLEJACH I TŁUSZCZACH
PRZEZNACZONYCH DO SPOŻYCIA ORAZ W SKŁADNIKACH TŁUSZCZOWYCH
LUB OLEJOWYCH ARTYKUŁÓW ROLNO-SPOŻYWCZYCH

Wymagania ogólne

I. Przygotowanie próbek

Masa próbki dostarczonej do laboratorium w celu przeprowadzenia analizy powinna wynosić 50 g, o ile nie jest wymagana większa ilość. Przed poddaniem analizie próbka musi być zhomogenizowana. Tak przygotowaną próbkę przechowuje się w szczelnych pojemnikach, bez dostępu powietrza i wilgoci.

II. Odczynniki

1) woda

Odczynnikiem do przeprowadzenia analizy jest woda.

W przypadku gdy w analizie wymagana jest woda jako rozpuszczalnik, do rozcieńczania lub do płukania, należy używać wody destylowanej lub demineralizowanej o przynajmniej równoważnej czystości.

Jeżeli w opisie metody analizy jest mowa o „rozpuszczeniu” lub „rozcieńczeniu” bez sprecyzowania żadnych innych odczynników, należy przez to rozumieć rozpuszczenie lub rozcieńczenie w wodzie.

2) inne odczynniki

Wszystkie używane związki chemiczne powinny być o uznanej czystości analitycznej, o ile nie zaznaczono inaczej.

III. Aparatura

W wykazie aparatury znajdują się tylko pozycje o specjalistycznym przeznaczeniu i zgodnie ze specyfikacją metody.

W celu przeprowadzenia analizy należy stosować wagę analityczną o dokładności minimum 0,1 mg.

IV. Wyrażanie wyników

Wyniki, które przedstawia się w oficjalnym raporcie z analizy, powinny być średnimi wartościami, uzy-

skanymi z nie mniej niż dwóch oznaczeń, których powtarzalność jest określona w części Oznaczanie kwasu erukowego w dziale VII pkt 5.

Procentową zawartość wyraża się, o ile nie zaznaczono inaczej, jako procentowy (m/m) udział C 22:1 do wszystkich kwasów tłuszczowych w próbce przekazanej do laboratorium.

Liczba cyfr znaczących w tak przedstawionym wyniku powinna zależeć od dokładności stosowanej metody.

Oznaczanie kwasu erukowego

I. Zakres i obszar stosowania

Poniższa metoda stosowana jest do oznaczania kwasu erukowego w:

- 1) olejach i tłuszczach roślinnych i zwierzęcych zawierających kwas cetoleinowy (specyficzny cis-izomer kwasu dokozenowego występujący w olejach rybich) i
- 2) utwardzonych olejach i tłuszczach roślinnych i zwierzęcych zawierających trans i cis-izomery kwasu dokozenowego,

jeżeli całkowita zawartość kwasów dokozenowych lub całkowita zawartość kwasów cis-dokozenowych przekracza 5 % zawartości wszystkich kwasów tłuszczowych w tłuszczu. W innych przypadkach zawartość kwasów dokozenowych lub kwasów cis-dokozenowych oznacza się metodą określoną w Polskiej Normie PN-EN ISO 5508:1996 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.

II. Definicja

Zawartość kwasu erukowego w rozumieniu rozporządzenia oznacza zawartość tego kwasu otrzymaną w wyniku stosowania metody analizy, określonej w dziale VI.

III. Zasada

Estry metylowe otrzymane z kwasów tłuszczowych wchodzących w skład roślinnych i zwierzęcych olejów i tłuszczów są rozdzielane przy pomocy niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej na płytkach z żelazem krzemionkowym z azotanem srebra i ilościowo oznaczane metodą chromatografii gazowej.

IV. Odczynniki

Do oznaczania kwasu erukowego stosuje się następujące odczynniki:

- 1) eter dwuetylowy wolny od nadtlenu, świeżo destylowany;
- 2) n-heksan;

- 3) żel krzemionkowy G, którego należy używać do chromatografii cienkowarstwowej;
- 4) żel krzemionkowy, którego należy używać do chromatografii kolumnowej;
- 5) roztwór azotanu srebra, 200 g/l, przygotowany w następujący sposób: rozpuszcza się 24 g azotanu srebra w wodzie i uzupełnia wodą do objętości 120 ml;
- 6) roztwór estru metylowego kwasu erukowego 5 mg/ml, przygotowany w następujący sposób: rozpuszcza się 50 mg estru metylowego kwasu erukowego w kilku ml n-heksanu i uzupełnia n-heksanem do objętości 10 ml;
- 7) tetrakozan metylu (standard wewnętrzny), 0,25 mg/ml, przygotowany w następujący sposób: rozpuszcza się 25 mg tetrakozanu metylu w kilku ml n-heksanu i uzupełnia n-heksanem do objętości 100 ml;
- 8) układ rozwijający. Toluen: n-heksan w proporcji 90:100 (v/v);
- 9) roztwór 2,7 dichlorofluoresceiny 0,5 g/l, przygotowany w następujący sposób: rozpuszcza się przy jednoczesnym ogrzewaniu i mieszaniu 50 mg 2,7 dichlorofluoresceiny w 100 ml 50 % wodnego roztworu metanolu.

V. Aparatura

1. Zestaw do chromatografii cienkowarstwowej powinien zawierać, w szczególności:

- 1) zamrażarkę do głębokiego mrożenia, odpowiednią do przechowywania komory rozwijającej i jej zawartości w temperaturze od minus 20° do minus 25 °C;
- 2) płytki do chromatografii cienkowarstwowej o wymiarach 200 mm x 200 mm;
- 3) lampę ultrafioletową;
- 4) szklane kolumny, długości około 200 mm, o wewnętrznej średnicy około 10 mm z filtrem z waty szklanej lub spiekem szklanym. Alternatywnie można stosować małe rozdzielacze z filtrem ze spiekem szklanym;
- 5) aplikator, do nanoszenia roztworów na płytki do chromatografii cienkowarstwowej w formie wąskiego pasma.

2. Chromatograf gazowy wraz z integratorem, który używa się w sposób określony w Polskiej Normie PN-EN ISO 5508:1996 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.

VI. Wykonanie oznaczenia

1. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Pobiera się około 400 mg olejowego lub tłuszczowego składnika próbki do analizy i przygotowuje roz-

twór zawierający około 20 do 50 mg/ml estrów metylo-
wych kwasów tłuszczowych w n-heksanie, zgodnie
z procedurą określoną w Polskiej Normie PN-EN
ISO 5508:1996 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce.
Analiza estrów metylo-
wych kwasów tłuszczowych
metodą chromatografii gazowej.

2. Chromatografia cienkowarstwowa

1) przygotowanie płytek

W 500 ml kolbie stożkowej umieszcza się 60 g żelu
krzemionkowego G, dodaje 120 ml roztworu azota-
nu srebra, przygotowanego w sposób określony
w dziale IV pkt 5, i wytrząsa przez minutę, aby
otrzymać całkowicie jednorodną masę.

Przygotowaną masę równomiernie pokrywa się płyt-
kę, grubość warstwy powinna wynosić około 0,5 mm.
Ta ilość masy jest wystarczająca do przygotowania
pięciu płytek o wymiarach 200 mm x 200 mm.

Wstępnie suszy się płytki na powietrzu (najlepiej
pozostawiając je bez dostępu światła przez około
30 minut). Całkowicie suszy się i aktywuje płytki,
umieszczając je w suszarce o temperaturze
100 °C ±2 °C przez 2,5 godziny. Po zaktywowaniu
zużywa się płytki jak najszybciej lub ostrożnie prze-
chowuje w specjalnej szafce do przechowywania
płytek chromatograficznych bez dostępu światła,
następnie ponownie aktywuje się przed użyciem.
Aktywacja w 110 °C przez godzinę może okazać się
wystarczająca, o ile płytki nie ciemnieją w wyniku
tego procesu. Przed użyciem zaznacza się linię
w warstwie złoża w odległości 10 mm od bocznych
i górnych krawędzi każdej płytki w celu zredukowa-
nia wpływu krawędzi podczas rozwijania.

2) nanoszenie estrów metylo- wych

Przy pomocy aplikatora, spełniającego warunki
określone w dziale V ust. 1 pkt 5, nanosi się 50 µl
roztworu estrów metylo-
wych, określonego
w ust. 1, przygotowanego z próbki, wąskim pa-
smem o długości około 50 mm, co najmniej
40 mm od bocznych krawędzi i 10 mm od dolnej
krawędzi płytki. W ten sam sposób nanosi się
100 µl roztworu zawierającego równe objętości
przygotowanego roztworu estrów metylo-
wych, określonego w ust. 1 i roztworu estru metylo-
wego kwasu erukowego, przygotowanego w sposób
określony w dziale IV pkt 6. Roztwory należy nano-
sić ze szczególną ostrożnością ze względu na deli-
katność pokrycia. Jeśli potrzeba, można nanieść na
płytkę 50 µl roztworu eruczynu metyłu, przygoto-
wanego w sposób określony w dziale IV pkt 6,
w celu ułatwienia identyfikacji prążka tego estru po
rozwinieniu. Po naniesieniu estrów metylo-
wych wstawia się płytkę dolną krawędzią do eteru etylo-
wego, dopóki eter nie osiągnie wysokości około
5 mm powyżej miejsca naniesienia próbki. To kon-
centruje estry etylowe w wąskim paśmie.

3) rozwijanie płytek

Układ rozwijający, spełniający warunki, o których
mowa w dziale IV pkt 8, wlewa się do komory chro-
matograficznej na wysokość około 5 mm, przykry-
wa pokrywą i umieszcza w pojemniku zamrażarki,
spełniającej warunki określone w dziale V ust. 1
pkt 1, o temperaturze -25 °C, lub w temperaturze
jak najbardziej do niej zbliżonej (w niektórych przy-
padkach korzystne może być wyścietanie naczynia
bibułą filtracyjną). Pod dwóch godzinach płytkę
ostrożnie umieszcza się w komorze chromatogra-
ficznej i pozwala, aby rozpuszczalnik osiągnął wy-
sokość około połowy lub dwóch trzecich wysoko-
ści płytki. Płytkę wyjmuje się i delikatnie odparow-
uje rozpuszczalnik w strumieniu azotu pod wcią-
giem. Ponownie umieszcza się płytkę w komorze,
pozwala się, aby rozpuszczalnik osiągnął górną
krawędź płytki. Płytkę wyjmuje się i, jak poprzed-
nio, suszy w strumieniu azotu, następnie ostrożnie
spryskuje roztworem 2,7 dichlorofluoresceiny
przygotowanego w sposób określony w dziale IV
pkt 9.

Płytkę ogląda się w świetle ultrafioletowym i lokali-
zuje pasmo zawierające eruczyn metyłu w badanej
próbce poprzez odniesienie do wzmocnionego pa-
sma w próbce, do której dodano eruczyn metyłu.

4) rozdzielanie frakcji estrów metylo- wych

Ostrożnie zeszkrobuje się pasmo eruczynu metyłu
uzyskane z badanej próbki do 50 ml zlewki, unika-
jąc strat. W ten sam sposób przenosi się warstwę
żelu krzemionkowego umieszczoną nad i pod pa-
smem estrów metylo-
wych do drugiej 50 ml zlewki.
To pasmo będzie zawierać frakcje wszystkich in-
nych estrów metylo-
wych kwasów tłuszczowych.
Do każdej zlewki dodaje się 1,0 ml standardowego
roztworu tetrakozanu metyłu, przygotowanego
w sposób określony w dziale IV pkt 7, i 10 ml eteru
dwyetylo-
wego, wolnego od nadtlenu, świeżo
destylowanego. Miesza się i przenosi zawartość
zlewki do rozdziału na oddzielnych kolumnach lub
rozdzielaczach, określonych w dziale V ust. 1 pkt 4
zawierających około 1 g żelu krzemionkowego,
używanego do chromatografii kolumnowej; eluuje
się estry metylowe używając trzech lub czterech
10 ml porcji eteru dwuetylo-
wego. Filtrat zbiera
się do małych kolb okrągłodennych lub gruszkow-
ych o stożkowym dnie. Każdy filtrat odparowuje
się do małej objętości, używając łagodnego stru-
mienia azotu. Estry metylowe przenosi się do ma-
łych szklanych probówek o stożkowym dnie. Roz-
puszczalnik usuwa się przez odparowanie w stru-
mieniu azotu tak, aby estry metylowe koncentro-
wały się na dnie probówek. Estry metylowe roz-
puszcza się w około 25—50 µl n-heksanu.

5) Po przeprowadzeniu badań uzyskuje się typowy
chromatogram cienkowarstwowy pokazujący roz-
dział estrów metylo-
wych kwasu erukowego, kwa-
su cetoleinowego i trans-izomerów kwasu dokoze-
nowego, według wzoru:

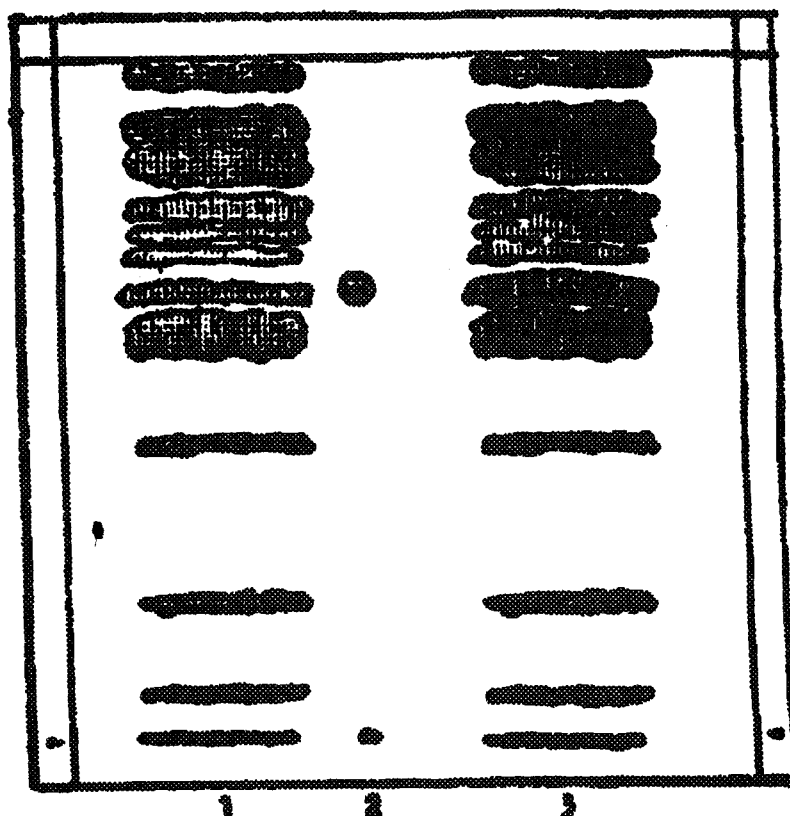
estry metylowe
nasyconych
kwasów tłuszczowych

trans-izomery

eruczan metylu¹⁾
cetoleinian metylu

estry
mononienasyconych
kwasów tłuszczowych

estry dwu-
polinienasyconych
kwasów tłuszczowych



1. próbka
2. eruczan metylu
3. próbka + eruczan metylu

¹⁾ Frakcja oznaczająca eruczan metylu zwykle będzie zawierać estry metylowe innych kwasów mononienasyconych, ale powinna być wolna od cetoleinianu metylu.

3. Chromatografia gaz-ciecz

1) postępując zgodnie z procedurą określoną w Polskiej Normie PN-EN ISO 5508:1996 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej, analizuje się 1—2 µl roztworów estrów metylowych uzyskanych z frakcji zawierającej eruczan metylu, określonej w pkt 2 lit. a i frakcji zawierającej pozostałe estry metylowe kwasów tłuszczowych, określonej w pkt 2 lit b;

2) przy pomocy integratora otrzymuje się następujące powierzchnie pików:

a) z chromatogramu frakcji zawierającej eruczan metylu:

- powierzchnię pików eruczanu metylu (E),
- powierzchnię pików standardu wewnętrznego (L_1),
- całkowitą powierzchnię wszystkich pików estrów metylowych z wyłączeniem powierzchni pików standardu wewnętrznego (EF),

b) z chromatogramu frakcji zawierającej pozostałe estry metylowe kwasów tłuszczowych:

— całkowitą powierzchnię wszystkich pików estrów metylowych z wyłączeniem powierzchni pików standardu wewnętrznego (RF),

— powierzchnię pików standardu wewnętrznego (L_2).

VII. Obliczanie wyników

Metoda obliczania i wzór

1) zawartość kwasu erukowego w badanej próbce, wyrażona jako procentowy udział jego estru metylowego w całkowitej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych, otrzymanych z próbki, jest określona przez:

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

gdzie E, EF, RF, L_1 i L_2 są powierzchniami pików opisanymi w dziale VI ust. 3 pkt 2, skorygowanymi, jeżeli jest to konieczne, za pomocą współczynników kalibracyjnych.

Dla celów praktycznych wartość eruczanu metylu obliczona za pomocą powyższego wzoru jest równoważna zawartości kwasu erukowego wyrażonej jako procent całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych w próbce.

- 2) jeżeli powierzchnie pików są wyrażone w procentach, to wartości EF i RF mogą być obliczone w następujący sposób:

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2$$

- 3) metoda obliczania, określona w pkt 1 zakłada, że zawartość kwasu tetrakozanowego w próbce jest nieistotna. Jeżeli znacząca ilość kwasu tetrakozanowego jest obecna w próbce, to ilość tego kwasu (L_2) otrzymaną z chromatogramu frakcji zawierającej pozostałe estry metylowe kwasów tłuszczowych należy zredukować do:

$$L_2 - T_2$$

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

T_2 — powierzchnia pików tetrakozanu metylu pochodząca z próbki, która tworzy część powierzchni pików przypisanego do wzorca wewnętrznego na chromatogramie z frakcji zawierającej pozostałe estry metylowe kwasów tłuszczowych,

P_2 — powierzchnia pików palmitynianu metylu otrzymana z chromatogramu frakcji zawierającej pozostałe estry metylowe kwasów tłuszczowych,

T_0 — powierzchnia pików tetrakozanu metylu uzyskana z chromatogramu estrów metylowych wszystkich kwasów tłuszczowych,

P_0 — powierzchnia pików palmitynianu metylowego uzyskana z chromatogramu estrów metylowych całkowitej ilości kwasów tłuszczowych.

- 4) wyprowadzenie wzoru

Proporcję kwasów tłuszczowych we frakcji zawierającej eruczan metylu, wyrażoną jako procentową zawartość wszystkich kwasów tłuszczowych w próbce, określa się w następujący sposób:

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

Proporcję kwasu erukowego we frakcji zawierającej eruczan metylu, wyraża się jako

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

Zawartość kwasu erukowego w próbce, wyrażoną jako procentowy udział we wszystkich kwasach tłuszczowych, określa się jako:

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

- 5) powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych jednocześnie lub w krótkim odstępie czasu na tej samej próbce, przez tego samego analityka, w tych samych warunkach, nie powinna przekraczać 10 % wyniku lub 0,5 g na 100 g próbki, biorąc pod uwagę wyższą wartość.