

Stofnaam	Erucazuur
Type methode	Gas-vloeistofchromatografie.
Te onderzoeken in	Oliën en vetten
Minimum bepaalbaarheidsgrens	-
Herhaalbaarheid	Max. 10 % in relatieve waarde van de bepaalde waarde of 0,5 g per 100 g monster in absolute waarde indien dit groter is
Reproduceerbaarheid (binnen laboratorium)	-
Aantoonbaarheid	-
Categorie	A
Titel	Richtlijn 80/891/EEG; communautaire analysemethode voor de bepaling van het gehalte aan erucazuur in oliën en vetten die als zodanig voor menselijke consumptie zijn bestemd, alsmede in levensmiddelen waaraan oliën of vetten zijn toegevoegd

I. INLEIDING

1. VOORBEHANDELING VAN HET MONSTER

1.1. Algemeen

De hoeveelheid laboratoriummonster die bestemd is voor de analyse moet normaal 50 g bedragen.

1.2. Voorbehandeling van het monster

Voor de analyse moet het monster worden gehomogeniseerd.

1.3. Bewaring

Het aldus behandelde monster moet steeds in een hermetisch gesloten recipiënt worden bewaard.

2. REAGENTIA

2.1. Water

2.1.1. Waar sprake is van water voor oplossingen, verdunningen of wassingen wordt steeds gedestilleerd water of gedemineraliseerd water met een minstens gelijkwaardige zuiverheidsgraad bedoeld.

2.1.2. Waar sprake is van een "oplossing" of een "verdunning", zonder verdere aanduiding van reagens, wordt een oplossing of verdunning in water bedoeld.

2.2. Chemicaliën

Tenzij anders vermeld, moeten alle chemicaliën p.a. zijn.

3. APPARATUUR

3.1. Apparatuurlijst

In de lijst van het materiaal wordt verwezen naar een uitrusting voor gespecialiseerd gebruik met bijzondere specificaties.

3.2. Analytische balans

Onder analytische balans wordt een balans met een gevoeligheid van ten minste 0,1 mg verstaan.

4. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

4.1. Resultaten

Het gerapporteerde resultaat van de analyse dient het gemiddelde te zijn van ten minste twee bepalingen, die voldoen aan de eisen van de herhaalbaarheid.

4.2. Berekening van het percentage

Indien niet anders gespecificeerd, worden de resultaten berekend in massa percenten (m/m) van de totale vetzuren van de aan het laboratorium ter onderzoek aangeboden waar.

4.3. Aantal significante cijfers

Het resultaat dient niet meer significante cijfers te bevatten dan overeenkomt met de nauwkeurigheid van de gebruikte methode van onderzoek.

II. BEPALING VAN ERUCAZUUR

1. DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

Volgens deze methode kan het erucazuurgehalte worden bepaald van: a) oliën en vetten die cetoleïnezuur (een cis-isomeer van docoseenzuur dat voorkomt in visoliën) bevatten, en

b) gehydrogeneerde oliën en vetten die cis- en trans-isomeren van docoseenzuur bevatten.

2. DEFINITIE

Erucazuurgehalte : volgens de beschreven methode bepaald erucazuur.

3. PRINCIPE

Scheiding van de vetzuurmethylesters, met behulp van dunnelaagchromatografie uitgevoerd bij lage temperatuur op met zilvernitraat behandeld absorbens en kwantitatieve bepaling van de afgescheiden esters met behulp van gas-vloeistofchromatografie.

4. REAGENTIA

4.1. Diëthylether peroxydevrij (vers gedistilleerd).

4.2. n-Hexaan.

4.3. Silicagel G voor dunnelaagchromatografie.

4.4. Silicagel voor kolomchromatografie.

4.5. Zilvernitraatoplossing 200 g/l. Los 24 g zilvernitraat op in water en vul aan tot 120 ml met water.

4.6. 5 mg/ml methylerucaatoplossing. Los 50 mg methylerucaat op in enkele ml n-Hexaan en vul aan tot een volume van 10 ml met n-Hexaan.

4.7. Methyltetracosanoaat, interne-standaardoplossing, 0,25 mg/ml. Los 25 mg methyltetracosanoaat op in enkele ml n-Hexaan (als 4.6) en vul aan tot een volume van 100 ml met n-Hexaan, 90 : 10 (v/v).

4.8. Loopvloeistof. Tolueen : n-Hexaan ; 90 : 10 (v/v).

4.9. 2,7 dichloorfluoresceïn-oplossing, 0,5 g/l. Los, onder verwarmen en roeren, 50 mg 2,7 dichloorfluoresceïn op in 100 ml van een 50 % -oplossing van methanol in water.

5. APPARATUUR

5.1. Apparatuur voor dunnelaagchromatografie:

5.1.1. Diepvriezer, waarmede de ontwikkeltank en de inhoud ervan op een temperatuur van minus 20 °C tot minus 25 °C kan worden gehouden.

5.1.2. Glasplaten, 200 mm x 200 mm,

5.1.3. Ultravioletlamp.

5.1.4. Glazen kolommen, lengte 200 mm en binnendiameter 10 mm, die voorzien zijn van een filter van glaswol of van gesinterd glas of eventueel kleine trechters met een filter van gesinterd glas.

5.1.5. Opbrengapparaat voor het opbrengen van de oplossingen als een smalle band of een streep.

5.2. Apparatuur voor gas-vloeistofchromatografie met een elektronische integrator als beschreven in deel III van bijlage VI bij Verordening (EEG) nr. 72/77 van de Commissie.

6. UITVOERING

6.1. Bereiding van de vetzuurmethylesters

Neem ongeveer 400 mg van het olie- of het vetmonster en maak een oplossing met ongeveer 20 tot 50 mg/ml vetzuurmethylesters in hexaan volgens de in deel II.3 van bijlage VI bij Verordening (EEG) nr. 72/77 van de Commissie beschreven methode.

6.2. Dunnelaagchromatografie

6.2.1. Bereiding van de platen

Breng 60 g silicagel (4.3) in een rondbodempkolf van 500 ml. Voeg 120 ml zilvernitraatoplossing (4.5) toe en schud gedurende 1 minuut, ten einde een homogene massa te verkrijgen. Maak hiermee op de gebruikelijke manier platen met een laagdikte van 0,5 mm. Deze hoeveelheid is voldoende voor het maken van vijf platen van 200 x 200 mm.

Laat de platen aan de lucht drogen (bij voorkeur in het donker gedurende 30 minuten). Droog en activeer ze vervolgens in een oven bij 100 °C gedurende 2 uur en 30 minuten. Gebruik de platen zo spoedig mogelijk na de activering of bewaar ze zorgvuldig in het donker en activeer ze voor het gebruik. Trek voor het gebruik door de aangebrachte laag strepen op 10 mm van de zijkanten en van de bovenkant van iedere plaat ten einde randeffecten die gedurende de ontwikkeling kunnen optreden tot een minimum te beperken. (Opmerking : Activering bij 110 °C gedurende 1 uur kan bevredigend worden geacht op voorwaarde dat de platen niet donker zijn geworden.)

6.2.2. Opbrengen van de methylesters

Breng met het opbrengapparaat (5.1.5) 50 µl van de uit het monster bereide methylesteroplossing (6.1) in een smalle band van ongeveer 50 mm lengte aan op ten minste 40 mm van de zijkant en 10 mm van de onderkant van de plaat. Breng op dezelfde manier 100 µl op van een oplossing die gelijke hoeveelheden van de methylesteroplossing (6.1) en de methylerucaatoplossing (4.6) bevat. Het opbrengen van de oplossingen moet zeer zorgvuldig geschieden om beschadiging van de plaat te voorkomen. Na het opbrengen van de methylesters kan de onderkant van de plaat in diëthylether worden geplaatst totdat de ether opstijgt tot ongeveer 5 mm boven de zone waar het monster is opgebracht. Dit heeft tot gevolg dat de methylesters in een smalle band geconcentreerd worden. Opmerking : Indien gewenst kan 50 µl methylerucaatoplossing (4.6) op de plaat worden aangebracht om de identificatie van de methylerucaatband na het ontwikkelen te vergemakkelijken (zie afbeelding).

6.2.3. Ontwikkelen van de platen

Giet zoveel loopvloeistof (4.8) in de tank dat een vloeistofhoogte van ongeveer 5 mm wordt verkregen en plaats de tank, voorzien van het deksel, in een diepvriezer (5.1.1) waarvan de temperatuur is afgesteld op min. 25 °C of op een temperatuur die deze temperatuur zo dicht mogelijk benadert. (In bepaalde gevallen verdient het aanbeveling de tank van een inwendige bekleding te voorzien.) Plaats twee uur later de plaat zorgvuldig in de tank en laat de loopvloeistof opstijgen tot ongeveer de helft tot twee derde van de hoogte van de plaat. Verwijder de plaat en damp de loopvloeistof geleidelijk van de plaat met behulp van een stikstofstroom. Plaats de plaat opnieuw in de tank en laat de loopvloeistof opstijgen tot aan de bovenkant van de plaat. Verwijder de plaat en droog met een stikstofstroom zoals hierboven ; besproei vervolgens met 2,7 dichloorfluoresceïne-oplossing (4.9). Onder ultraviolet licht kan de methylerucaatband in het monster worden gelokaliseerd aan de hand van de band die zich aftekent bij het monster waaraan methylerucaat is toegevoegd (zie afbeelding).

6.2.4. Scheiding van de methylesterfracties

Krab de van het monster afkomstige methylerucaatband kwantitatief af in een bekersglas van 50 ml. Krab het silicagel boven en onder de methylerucaatband met alle andere vetzuurmethylesterfracties kwantitatief af in een ander bekersglas van 50 ml. Voeg aan ieder bekersglas 1,0 ml methyltetracosanoaat-standaardoplossing (4.7) en 10 ml diëthylether (4.1) toe. Roer en breng de inhoud van de bekersglazen separaat over in de kolommen of filters (5.1.4) die ongeveer 1 g silicagel (4.4) bevatten en extraheer de esters met drie of vier porties diëthylether van 10 ml. Vang de filtraten op in kleine kolven. Verdamp de filtraten tot kleine volumes met behulp van een lichte stikstofstroom en breng de methylesters over in kleine glazen buisjes met puntige onderkant. Verwijder alle loopvloeistof door verdamping met behulp van stikstof en wel zodanig dat de methylesters op de bodem van de buisjes worden geconcentreerd. Los de methylesters op in ongeveer 25 tot 50 µl hexaan (4.2).

6.3. Gas-vloeistofchromatografie

6.3.1. Volg de in deel III van bijlage VI bij Verordening (EEG) nr. 72/77 van de Commissie beschreven werkwijze en injecteer 1 - 2 μ l van de methylesteroplossingen verkregen van (i) de fractie die methylerucaat bevat, (ii) de fracties die de rest van de vetzuurmethylesters bevatten.

6.3.2. Met de elektronische integrator worden de volgende piekoppervlakken verkregen: (i) uit het chromatogram van de fractie die methylerucaat bevat: a) methylerucaat [E], b) interne standaard [L1], c) totaal methylesterpiekoppervlakken met uitzondering van de interne standaard [EF]; (ii) uit het chromatogram van de fracties die de rest van de vetzuurmethylesters bevatten: a) totaal piekoppervlakken met uitzondering van de interne standaard [RF], b) interne standaard [L2].

7. WEERGAVE VAN DE RESULTATEN

7.1. Wijze van berekening en formule

7.1.1. Het erucazuurpercentage van het monster uitgedrukt als methylester in percenten van het percentage in methylesters van de totale vetzuren van het monster wordt verkregen door de formule: >PIC FILE= "T0013773">
hierin zijn : E, EF, RF, L1 en L2 de piekoppervlakken verkregen in 6.3.2, zo nodig gecorrigeerd aan de hand van ijkfactoren. Het percentage aan methylerucaat dat wordt verkregen door toepassing van bovenstaande formule is in de praktijk gelijk aan het percentage aan erucazuur, uitgedrukt in percenten van het totale percentage aan vetzuren.

7.1.2. Wanneer de piekoppervlakken in percenten worden uitgedrukt, dan zijn de EF- en RF-waarden als volgt te berekenen:

$$EF = 100 - L1,$$
$$RF = 100 - L2.$$

7.1.3. Bij de aangehouden wijze van berekening (7.1.1) is aangenomen dat het tetracosaanpercentage van het monster te verwaarlozen is. Bij aanwezigheid van een significante hoeveelheid van dat zuur kan de tetracosaanpercentage (L2) verkregen met behulp van het chromatogram van de fracties die de overige vetzuurmethylesters bevatten, worden herleid tot:

L2 - T2

hierin is: >PIC FILE= "T0013774">

en

T2 = piekoppervlak van tetracosaanzure methylester dat is verkregen uit het monster en een deel vormt van het piekoppervlak dat moet worden toegeschreven aan de interne standaard van het chromatogram van de resterende fractie van de vetzuurmethylesters;

P2 = piekoppervlak van palmitinezure methylester, verkregen met behulp van het chromatogram van de resterende fractie;

T0 = piekoppervlak van tetracosaanzure methylester, verkregen met behulp van het chromatogram van het totale vetzuurmethylesterpercentage, bepaald door middel van de in artikel 2 van de richtlijn genoemde analyse;

P0 = piekoppervlak van palmitinezure methylester, verkregen met behulp van het chromatogram van het totale vetzuurmethylesterpercentage, bepaald door middel van de in artikel 2 van de richtlijn genoemde analyse.

7.1.4. Oorsprong van de formule

Het vetzuurpercentage van de fractie die methylerucaat bevat, in % van het totale vetzuurpercentage van het monster, wordt verkregen aan de hand van de volgende formule:

>PIC FILE= "T0013775">

7.1.5. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee, gelijktijdig door dezelfde analist uitgevoerde en in dezelfde omstandigheden, parallelbepalingen aan hetzelfde monster mag niet meer bedragen dan 10 % in relatieve waarde van de bepaalde waarde of 0,5 g per 100 g monster in absolute waarde indien dit groter is.