

4. melléklet a .../2010. (... ..) VM rendelethez

„33. melléklet a 152/2009. (XI. 12.) FVM rendelethez

A Magyar Élelmiszerkönyv 3-1-80/891 számú előírása az étolaj, étkezési zsír, valamint ezek hozzáadásával készült élelmiszerek erukasav-tartalmának meghatározási módszeréről

A Magyar Élelmiszerkönyvnek az étolajokban, zsírokban, valamint hozzáadott étolajat és zsírt tartalmazó élelmiszerekben megengedett erukasav-tartalomról szóló 1-3-76/621 számú előírása 1. pontjában szereplő termékek erukasav-tartalmának meghatározását a következőkben leírt módszer szerint kell elvégezni.

1. Tárgy és alkalmazási terület

Ezzel a módszerrel az erukasav-tartalmat lehet meghatározni

- a) olajokban és zsírokban, az esetleg jelenlevő cetolajsav (a dokozensav cisz-izomérje, amely a halolajokban fordul elő) mellett;
- b) hidrogénezett olajokban és zsírokban a cetolajsav és a dokozensav transz-izomérjei mellett.

2. Fogalom-meghatározás

Erukasav-tartalom: az erukasav mennyisége a leírt módszer szerint meghatározva.

3. A módszer elve

A zsírsavak metilésztereit ezüst-nitrátot tartalmazó vékonyréteg lemezen kis hőmérsékleten elválasztjuk. Az elválasztott észterek mennyiségét gázkromatográffal meghatározzuk.

4. Vegyszerek

4.1. Víz

4.1.1. Ha az oldáshoz, hígításhoz és mosáshoz vizet használunk, úgy azon mindig desztillált vizet, vagy azzal azonos minőségű ionmentes vizet értünk.

4.1.2. Ha „oldásnál” vagy „hígításnál” a reagensre semmilyen utasítás nincs megadva, úgy az mindig vízben történő oldás, illetve vízzel történő hígítást jelent.

4.2. Vegyszerminőség

Amennyiben semmilyen ellenkező utasítás nincs, az összes felhasznált vegyszernek „analitikai legtisztább”(alt.) minőségűnek kell lennie.

4.3. Frissen desztillált dietil-éter, peroxidmentes.

4.4. n-Hexán

4.5. Szilikagél G, (Kieselgel G), réteg-kromatográfias célra.

4.6. Szilikagél G, (Kieselgel G), oszlop-kromatográfias célra.

4.7. Ezüst-nitrát oldat, 200 g/l: 24 g ezüst-nitrátot vízben feloldunk, majd vízzel 120 ml-re feltöltjük.

4.8. Erukasav-metilészter oldat, 5 mg/ml: 50 mg erukasav-metilésztert néhány ml n-hexánban feloldunk, majd n-hexánnal 10 ml-re feltöltjük.

4.9. Tetrakozánsav-metilészter oldat, belső standard, 0,25 mg/ml: 25 mg tetrakozánsav-metilésztert néhány ml n-hexánban oldunk (mint a 4.8-nál) és 100 ml-re feltöltjük.

- 4.10. Futtatószer: toluol : n-hexán = 90 : 10 arányú (v/v) elegye.
- 4.11. 2,7-diklór-fluorescein oldat, 0,5 g/l: 50 mg 2,7- diklór-fluoresceint melegítés és keverés közben 100 ml 50%-os vizes metanolban oldunk.

5. Eszközök

- 5.1. Analitikai mérleg 0,1 mg mérési pontossággal
- 5.2. Vékonyréteg-kromatográfias eszközök és a következők:
- 5.2.1. Fagyasztószekrény, amelynek tároló-hőmérséklete mínusz 20 °C és mínusz 25 °C között van
- 5.2.2. Üveglapok, 200 mm x 200 mm-es
- 5.2.3. UV-lámpa
- 5.2.4. Üvegoszlop, 200 mm hosszú, belső átmérője 10 mm, üvegyapottal vagy üvegszűrő lappal ellátva, ennek hiányában kis üveg szűrőtölcsér is használható
- 5.2.5. Eszközök az oldatok vékony csík vagy vonal formájában történő felviteléhez.
- 5.3. Gázkromatográf elektronikus integrátorral, MSZ ISO 5508 szerint.

6. A minta előkészítése

6.1. Általános rész

A vizsgálandó minta mennyisége 50 g, amennyiben nagyobb mennyiségre nincs szükség.

6.2. A minta vizsgálat előtti előkészítése

A mintát vizsgálat előtt homogenizálni kell.

6.3. Tárolás

Az előkészített mintát állandóan egy jól zárható edényben kell tárolni.

7. A vizsgálat menete

7.1. A zsírsav-metilészterek előállítása.

Kb. 400 mg olaj- vagy zsírmintából az MSZ ISO 5509 szerint zsírsavmetilészter oldatot állítunk elő, amely kb. 50 mg/ml zsírsavmetilésztet tartalmaz hexánban oldva.

7.2. Vékonyréteg-kromatográfia.

7.2.1. A rétegek előállítása.

60 g szilikagélt (4.5.) és 120 ml ezüst-nitrát oldatot (4.7.) egy 500 ml-es gömblombikba mérünk és homogén szuszpenzió előállítása céljából egy percig rázzuk. A szuszpenziót a szokásos módon kb. 0,5 mm rétegvastagságban a lemezre felvisszük. A mennyiség 5 db 200 mm × 200 mm-es lemez befedésére elegendő. A lemezeket levegőn megszáritjuk (a legjobb kb. 30 percig sötétben végezni); utána kb. 2 óra 30 percig 100 °C-on szárítószekrényben szárítjuk, aktiváljuk. Az aktiválás után a lemezeket amilyen gyorsan csak lehet, használjuk fel, ha szükséges sötétben kell azokat tárolni és felhasználás előtt újból aktiválni.

Megjegyzés: 110 °C-os egyórás aktiválás elegendő, amennyiben a lemezek színe eközben nem sötétedik meg. Amennyiben az oldalhatást el akarjuk kerülni, úgy minden lemezre az oldalaktól és a felső széltől 10 mm távolságra, a rétegre egy vonalat karcoljunk, mielőtt a lemezt használnánk.

7.2.2. A metilészter felvitel.

Felvivőeszközzel (5.2.5.) a mintából előállított metilészter oldatból (7.1.) 50 µl-t felviszünk a rétegre kb. 50 mm-es vonalban, legalább 40 mm-re az oldalaktól és 10 mm-re a lemez alsó szélétől. Ezután felviszünk 100 µl-t a mintából előállított metilészter oldatot (7.1.) és az

erukasav-metilészter oldatot (4.8.) 1:1 arányú keverékéből. A lemez fényérzékenysége miatt az oldatok felvitelénél különös figyelemmel kell eljárni. A metilészter felvitele után a lemez alsó szélét dietil-éterbe meríthetjük addig, amíg az éterfront kb. 5 mm-el a startvonal fölé emelkedik. Ezáltal a metilészter egy szűk csíkban koncentrálódik.

Megjegyzés: felvihetünk még 50 µl erukasav-metilészteroldatot (4.8.) a lemezre abból a célból, hogy kifejlés után az erukasav-metilésztert tartalmazó zónában az azonosítást megkönnyítsük (lásd: az ábrát).

7.2.3. A kromatogram kifejlésztése

A megfelelő futtatószeret (4.10.) a futtatókádba öntjük úgy, hogy magassága 5 mm legyen, és a fedőt rátéve egy fagyasztószekrénybe tesszük (5.2.1.), amelynek hőmérséklete mínusz 25 °C, vagy ehhez közel álló hőfokú. Bizonyos esetben célszerű lehet a futtatókád kibélelése, pl. szűrőpapírral (kb. két óra múlva alkalmas a kromatogram kifejlésztésére).

A lemezt óvatosan a futtatókádba állítjuk és hagyjuk a folyadékot kb. a lemez magasságának feléig, kétharmadáig felfutni. A lemez kivétele után az oldószer a lemeztől gyenge nitrogénárammal elpárologtatjuk. Ezután a lemezt újra a futtatókádba tesszük, és hagyjuk a folyadékot a lemez felső széléig felfutni. Végül a lemezt újra kivesszük, és a fent leírtak szerint nitrogénárammal megszáritjuk, majd 2,7-diklór-fluoreszcein oldattal (4.11.) lepermetezzük.

UV-fényben lehet meghatározni a minta erukasav-metilészter zónáját, összehasonlítva az erukasav-metilésztert tartalmazó minta intenzívebb zónájával (lásd: az ábrát).

7.2.4. A metilészter-frakció elkülönítése.

A minta erukasavmetilésztert tartalmazó zónáját a lemeztől teljes mennyiségben lekaparjuk, és egy 50 ml-es lombikba tesszük.

Az erukasav-metilészter feletti és alatti szilikagélt, amely az összes többi zsírsavmetilészter frakciót tartalmazza, a lemeztől hasonlóan lekaparjuk és egy másik 50 ml-es lombikba tesszük. Mindegyik lombikba 1,0 ml tetrakozánsav-metilésztert tartalmazó standard oldatot (4.9.) és 10 ml dietil-étert mérünk (4.3.). Összekeverjük és mindkét lombik tartalmát egyenként egy-egy kb. 1 g szilikagélt (4.6.) tartalmazó oszlopra, vagy üveg szűrőtölcsérré (5.2.4.) visszük.

Az észtert háromszor-négyszer 10 ml dietil-éterrel eluáljuk. Az eluátumokat kis lombikba gyűjtjük, gyenge nitrogénáramban az oldószer nagy részét óvatosan, kis részletekben elpárologtatjuk és azután kúpos végű üvegcsékbe átvisszük. A maradék oldószer nitrogénáramban elpárologtatjuk, a metil-észter az üvegcsé aljában koncentrálódik.

Végül a metilésztert kb. 25–50 µl hexánban feloldjuk. (4.4.)

7.3. Gázkromatográfia

7.3.1. Az MSZ ISO 5508 szerint leírt módszer alapján 1-2 µl metilészteroldatot befecskendezünk.

- a) az erukasav-metilésztert tartalmazó frakcióból, és
- b) abból a frakcióból, amely a többi zsírsav-metilésztert tartalmazza.

7.3.2. Elektronikus integrátor segítségével a következő csúcs alatti területeket határozzuk meg:

7.3.2.1. az erukasav-metilésztert tartalmazó frakció kromatogramjából:

- a) erukasav-metilészter (E),
- b) belső standard (L_1),
- c) az összes metilészter a belső standard nélkül (EF),

7.3.2.2. a többi zsírsav metilészterét tartalmazó frakció kromatogramjából:

- a) az összes metilészter a belső standard nélkül (RF),
- b) a belső standard (L_2).

8. Az eredmények kiszámítása

8.1. Számítás és képletek

8.1.1. A minta erukasav-tartalmát, amelyet mint metilészter az összes metilészter százalékában fejezzük ki, a következő képlettel számítjuk ki:

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

ahol:

E, EF, RF, L_1 , és L_2 a csúcs alatti területeket jelentik a 7.3.2. pontnak megfelelően, amelyeket szükség esetén egy hitelesítési faktorról korrigáltunk.

A képlettel meghatározott erukasav-metilészter tartalom jelenti a minta erukasav-tartalmát az összes zsírsavra vonatkoztatva.

8.1.2. Ha a csúcs alatti területeket százalékban fejezzük ki, akkor EF és RF-ként a következő értékeket alkalmazhatjuk:

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2$$

8.1.3. A 8.1.1. szerinti képlet feltételezi, hogy a minta tetrakozánsav-tartalma elhanyagolható. Ha a tetrakozánsav mennyisége mégis számottevő, úgy a tetrakozánsav értékét (L_2), amelyet a maradék frakció kromatogramjából határoztuk meg, csökkenteni kell:

$$(L_2 - T_2) \text{-re}$$

ahol:

$$T_2 = \frac{T_0 \cdot P_2}{P_0} \quad \text{és}$$

T_2 = a mintából származó tetrakozánsav-metilészter csúcs alatti területe, amely a részterülete a többi zsírsav-metilészter frakcióban lévő belső standard csúcs alatti területének.

P_2 = a palmitinsav-metilészter csúcs alatti területe a többi zsírsavészter frakciójának kromatogramjában.

T_0 = a tetrakozánsav-metilészter csúcs alatti területe az összes zsírsavat tartalmazó eredeti minta metilésztereinek kromatogramjában.

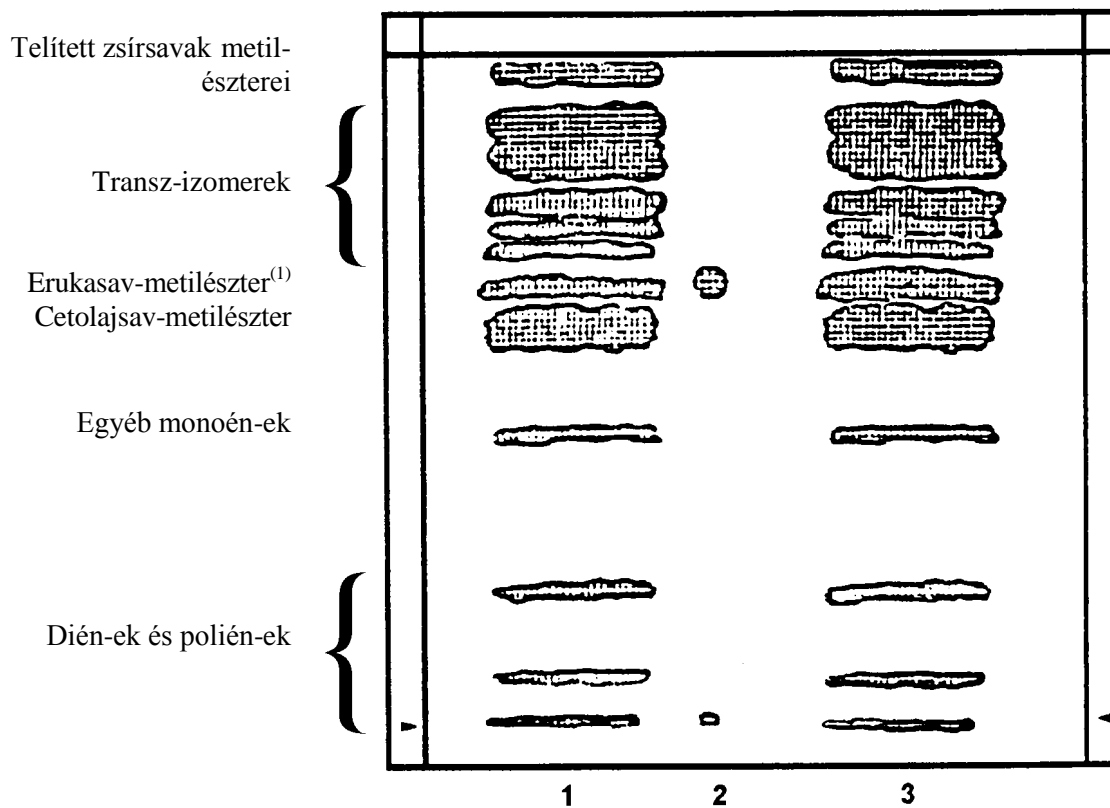
P_0 = a palmitinsav-metilészter csúcs alatti területe az összes zsírsavat tartalmazó eredeti minta metilésztereinek kromatogramjában.

9. Ismételtetés

Az ugyanazon a mintán, egy időben vagy gyors egymásutánban, azonos körülmények között, ugyanazon személy által elvégzett két meghatározás eredménye közötti különbség nem haladhatja meg az eredmény 10%-át vagy 0,5 grammot 100 gramm mintában, a magasabb érték figyelembevételével.

ÁBRA

Erukasav-, cetolajsav- és dokozensav transz-izomerek metilésztereinek vékonyréteg-kromatogramja



- 1 Minta
- 2 Erukasav-metilészter
- 3 Minta + erukasav-metilészter

⁽¹⁾ Az erukasav-metilészter-frakció egyéb, egy kettőskötést tartalmazó szénláncú zsírsav-metilésztereket is tartalmaz, de nem tartalmaz cetolajsav-metilésztert.