

# MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA

2343

Na temelju članka 94. stavka 2. Zakona o hrani («Narodne novine» br. 46/2007), ministar poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donosi

## PRAVILNIK

### O DOZVOLJENOM UDJELU ERUKA KISELINE U ULJIMA I MASTIMA

#### I. OPĆE ODREDBE

##### Članak 1.

- 1) Ovim se Pravilnikom propisuje najviši dozvoljeni udio eruka kiseline i metode određivanja udjela eruka kiseline u uljima, mastima i njihovim mješavinama (u daljnjem tekstu: proizvodi) namijenjenim za prehranu ljudi te u hrani u koju su dodana ulja, masti ili njihove mješavine, a u kojoj je udio masti veći od 5%.
- 2) Odredbe ovoga Pravilnika mogu se primijeniti i kada je udio masti jednak ili manji od 5%.

##### Članak 2.

Proizvodi iz članka 1. ovoga Pravilnika mogu se stavljati na tržište ako ukupni udio eruka kiseline ne prelazi 5%, računato na ukupne masne kiseline u ulju i/ili masti.

##### Članak 3.

- 1) Ukoliko se na osnovi novih podataka ili procjene postojećih, provedenih nakon stupanja na snagu ovoga Pravilnika, dođe do spoznaje da najviši dozvoljeni udio eruka kiseline utvrđen u članku 2. ovoga Pravilnika predstavlja opasnost za zdravlje ljudi, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (u daljnjem tekstu: Ministarstvo) može ograničiti primjenu te odredbe.
- 2) U slučaju iz stavka 1. ovoga članka, Ministarstvo će odmah izvijestiti Europsku komisiju i druge zemlje članice.

#### II. UTVRĐIVANJE SUKLADNOSTI

##### Članak 4.

- 1) Za utvrđivanje udjela eruka kiseline u proizvodima iz članka 1. ovoga Pravilnika koriste se sljedeće metode analize:
  - metoda navedena u Prilogu 1., koji je tiskan uz ovaj Pravilnik i njegov je sastavni dio, ili
  - metoda opisana u HRN EN ISO 5509:2004 Životinjske i biljne masti i ulja -- Priprava metilnih estera masnih kiselina i HRN EN ISO 5508:1999 Životinjske i biljne masti i ulja -- Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom.

- 2) U svrhu pregleda, određuje se jedno od sljedećeg:
- ukupni udio dokozenke kiseline u proizvodima iz članka 1. ovoga Pravilnika, po metodi navedenoj u stavku 1. podstavku 2. ovoga članka; ili
  - ukupni udio cis-dokozenke kiseline u proizvodima iz članka 1. ovoga Pravilnika, po metodi navedenoj u stavku 1. podstavku 2. ovoga članka, u uvjetima koji omogućavaju razdvajanje cis i trans izomera dokozenke kiseline.
- 3) Ukoliko ukupni udio:
- dokozenke kiseline, određen sukladno stavku 2. podstavku 1. ovoga članka; ili
  - cis-dokozenke kiseline, određen sukladno stavku 2. podstavku 2. ovoga članka, u proizvodima iz članka 1. ovoga Pravilnika, računato na ukupne masne kiseline u masnoj komponenti ne iznosi više od 5%, daljnje određivanje nije potrebno.
- 4) Ukoliko nije zadovoljen uvjet iz stavka 3. ovoga članka, udio eruka kiseline određuje se sukladno stavku 1. ovoga članka.

### III. PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

#### Članak 5.

- 1) Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objave u »Narodnim novinama«.
- 2) Iznimno od stavka 1. ovoga članka, odredba članka 3. stavka 2. ovoga Pravilnika stupa na snagu danom ulaska Republike Hrvatske u Europsku uniju.

Klasa: 011-02/08-01/7  
Urbroj: 525-13-08-1  
Zagreb, 10. lipnja 2008.

Ministar  
**mr. sc. Božidar Pankrećić**, v. r.

### PRILOG 1.

#### ODREĐIVANJE UDJELA ERUKA KISELINE U ULJIMA I MASTIMA NAMIJENJENIM ZA PREHRANU LJUDI TE U MASNOM ILI ULJNOM DIJELU HRANE U KOJU SU DODANA ULJA I MASTI

##### I. UVOD

##### 1. PRIPREMA UZORKA

###### 1.1. Općenito

Masa uzorka koji se dostavlja u laboratorij na analizu uobičajeno iznosi 50 g osim ukoliko se zahtijeva veća količina.

###### 1.2. Priprema uzorka za analizu u laboratoriju

Prije analize uzorak se mora homogenizirati.

###### 1.3. Posude

Tako pripremljen uzorak treba pohraniti u dobro zatvorenoj posudi.

##### 2. REAGENSI

###### 2.1. Voda

2.1.1. Ukoliko se voda koristi kao otapalo, za razrjeđivanje ili za pranje, treba koristiti

destiliranu ili demineraliziranu vodu najmanje jednake čistoće.

2.1.2. Pojam »otapanje« ili »razrjeđivanje«, bez navođenja bilo kakvog drugog reagensa, podrazumijeva otapanje u vodi ili razrjeđivanje vodom.

## 2.2. Kemikalije

Sve kemikalije koje se koriste moraju biti priznate analitičke čistoće, osim gdje je drugačije navedeno.

## 3. OPREMA

### 3.1. Popis opreme

Popis sadrži samo opremu za posebnu namjenu koja ima specifikaciju.

### 3.2. Analitička vaga

Pojam »analitička vaga« odnosi se na vagu osjetljivosti najmanje 0,1 mg.

## 4. IZRAŽAVANJE REZULTATA

### 4.1. Rezultati

Rezultat naveden u službenome izvješću o analizi predstavlja srednju vrijednost dobivenu iz najmanje dva određivanja koja zadovoljavaju kriterij ponovljivosti.

### 4.2. Izračun postotka

Ukoliko nije drugačije navedeno, rezultati moraju biti izraženi kao postotci (m/m) ukupnih masnih kiselina u uzorku zaprimljenom u laboratoriju.

### 4.3. Broj značajnih znamenki

Broj značajnih znamenki u tako izraženom rezultatu određen je preciznošću metode.

## II. ODREĐIVANJE ERUKA KISELINE

### 1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Metodom se određuje udio eruka kiseline:

- u uljima i mastima koje sadrže cetoleinsku kiselinu (poseban cis-izomer dokozenke kiseline koji se javlja u ribljim uljima), te
- u hidrogeniranim uljima i mastima koja sadrže trans- i cis-izomere dokozenke kiseline.

### 2. DEFINICIJA

Udio eruka kiseline: udio eruka kiseline određen opisanom metodom.

### 3. NAČELO

Metilni esteri masnih kiselina ulja i masti odvajaju se pri niskoj temperaturi tankoslojnom kromatografijom i kvantitativno određuju plinskom kromatografijom.

### 4. REAGENSI

4.1. Svježe destilirani dietil-eter bez peroksida.

4.2. n-heksan.

4.3. Silikagel G, za tankoslojnu kromatografiju.

4.4. Silikagel, za kolonsku kromatografiju.

4.5. Otopina srebrnog nitrata, 200 g/l.

Otopiti 24 g srebrnog nitrata u vodi i dopuniti vodom do 120 ml.

4.6. Otopina metil erukata 5 mg/ml.

Otopiti 50 mg metil erukata u nekoliko ml n-heksana i razrijediti s n-heksanom do 10 ml.

4.7. Metil tetrakozanoat, otopina internog standarda, 0,25 mg/ml.

Otopiti 25 mg metil tetrakozanoata u nekoliko ml n-heksana (kao 4.6.) te razrijediti s n-heksanom do 100 ml.

4.8. Otapalo za razvijanje.

Toluen: n-heksan 90:10 (v/v).

4.9. Otopina 2,7-diklorofluoresceina 0,5 g/l.

Uz zagrijavanje i miješanje otopiti 50 mg 2,7-diklorofluoresceina u 100 ml 50%-tne vodene otopine metanola.

## 5. PRIBOR

5.1. Pribor za tankoslojnu kromatografiju treba sadržavati:

5.1.1. Jedinicu za duboko zamrzavanje koja održava temperaturu kade za razvijanje i sadržaja od  $-20$  do  $-25$  °C.

5.1.2. Staklene ploče veličine 200 x 200 mm.

5.1.3. Ultraljubičastu (UV-) svjetiljku.

5.1.4. Staklene cijevi, dužine oko 200 mm, unutarnjeg promjera oko 10 mm s filterom od staklene vune ili sinter stakla. Kao alternativa mogu se koristiti mali lijevci s filterima od sinter stakla.

5.1.5. Pribor za nanošenje otopina u obliku traka ili pruga na ploče za tankoslojnu kromatografiju (TLC ploče).

5.2. Plinski kromatograf, s elektroničkim integratorom, kao što je opisano u HRN EN ISO 5508:1999.

## 6. POSTUPAK

6.1. Priprema metilnih estera masnih kiselina

Uzeti približno 400 mg uljne ili masne komponente uzorka za analizu i pripremiti otopinu koja sadrži oko 20 do 50 mg/ml metilnih estera masnih kiselina u n-heksanu pomoću metode opisane u HRN EN ISO 5509:2004.

6.2. Tankoslojna kromatografija

6.2.1. Priprema ploča

Staviti 60 g silikagela (4.3.) u tikvicu s okruglim dnom od 500 ml, dodati 120 ml otopine srebrnog nitrata (4.5.) i tresti jednu minutu kako bi se dobila potpuno homogena suspenzija. Suspenziju nanijeti na ploče na uobičajen način; debljina sloja trebala bi biti približno 0,5 mm. Ova količina suspenzije dovoljna je za pripremu pet ploča veličine 200 x 200 mm. Pustiti da se ploče djelomično osuše na zraku (najbolje tako da ih se ostavi u mraku približno 30 minuta). U potpunosti osušiti i aktivirati ploče stavljanjem u sušionik, na temperaturu od 100°C, 2 sata i 30 minuta. Nakon aktiviranja upotrijebiti ploče što prije ili ih pažljivo spremići u tamnu komoru te ih ponovno aktivirati prije uporabe. (Primjedba: aktiviranje pri 110°C u trajanju od sat vremena može se smatrati zadovoljavajućim pod uvjetom da ploče ne potamne). Prije uporabe povući crte kroz sloj na udaljenosti 10 mm od rubova i vrha svake ploče kako bi se smanjili rubni učinci tijekom razvijanja.

6.2.2. Nanošenje metilnih estera masnih kiselina

Koristeći pribor za nanošenje (5.1.5.) nanijeti 50 µl otopine metilnih estera (6.1.) pripremljene iz uzorka, u uskoj pruži duljine približno 50 mm, najmanje 40 mm od ruba ploče i 10 mm od dna. Na sličan način nanijeti 100 µl otopine koja sadrži jednaku količinu pripremljene otopine metilnih estera (6.1.) i otopine metil erukata (4.6.). Zbog osjetljivosti sloja, otopine treba pažljivo nanositi (Primjedba: ukoliko se to želi, na ploču se može nanijeti 50 µl otopine metil erukata (4.6.) kako bi se olakšalo utvrđivanje trake koja sadrži metil erukat nakon razvijanja: vidjeti sliku). Nakon nanošenja metilnih estera uroniti donji rub ploče u dietil-eter sve dok se eter ne uzdigne na približno 5 mm iznad područja nanošenja uzorka. Na ovaj se način metilni esteri koncentriraju u uskoj traci.

6.2.3. Razvijanje ploča

Uliti otapalo za razvijanje (4.8.) u kadu do visine od 5 mm i staviti kadu s poklopcem u jedinicu za duboko zamrzavanje (5.1.1.), držati na temperaturi od  $-25$  °C ili što je moguće bliže toj temperaturi. (Ako je potrebno, kadu treba poravnati). Nakon dva sata pažljivo staviti ploču u kadu i pričekati da se otapalo uzdigne do približno polovice ili dvije trećine visine ploče. Nakon toga izvaditi ploču i nježno ukloniti otapalo pomoću slabe struje dušika. Ponovno staviti ploču u kadu i pričekati da se otapalo uzdigne do vrha ploče. Izvaditi ploču te ju kao i prethodno osušiti u struji dušika i tada po njoj pažljivo raspršiti otopinu 2,7-diklorofluoresceina (4.9.).

Pregledati ploču pod ultraljubičastim (UV-) svjetlom i odrediti traku koja sadrži metil erukat u uzorku koristeći za usporedbu referentnu traku uzorka u koji je dodan metil erukat (vidjeti sliku).

#### 6.2.4. Odvajanje frakcija metilnih estera

Ostrugati traku koja sadrži metil erukat dobiven iz uzorka u čašu od 50 ml pazeći da ne bude gubitaka. Na isti način prenijeti silikagel smješten iznad i ispod trake koja sadrži metil erukat u drugu čašu od 50 ml. Ova traka sadržavat će sve ostale frakcije metilnih estera masnih kiselina. U svaku čašu dodati 1 ml standardne otopine metil tetrakozanoata (4.7.) i 10 ml dietil-etera (4.1.). Promiješati i prebaciti sadržaj čaša u odvojene kolone ili lijevke (5.1.4.), od kojih svaki sadrži približno 1 g silikagela (4.4.); ekstrahirati metilne estere koristeći tri do četiri porcije dietil-etera od 10 ml. Sakupiti filtrate u malene tikvice. Ispirati svaki filtrat do malenog volumena koristeći slabu struju dušika i prebaciti metilne estere u malene epruvete sa konusnim dnom. Ukloniti ostatak otapala isparavanjem u struji dušika na način da se metilni esteri koncentriraju na dnu. Otopiti metilne estere u 25 do 50  $\mu$ l n-heksana (4.2.).

#### 6.3. Plinska kromatografija

6.3.1. Provesti postupak kao što je u opisano u HRN EN ISO 5508:1999 i analizirati 1 do 2  $\mu$ l otopine metilnih estera dobivenih iz:

- frakcije koja sadrži metil erukat, te
- frakcija koje sadrže ostatak metilnih estera masnih kiselina.

6.3.2. Pomoću elektroničkog integratora dobivamo sljedeće površine pikova:

- iz kromatograma frakcije koja sadrži metil erukat: metil erukat [E], interni standard [ $L_1$ ], ukupne površine pikova metilnih estera masnih kiselina bez internog standarda [EF];
- iz kromatograma frakcija koje sadrže ostatak metilnih estera masnih kiselina: ukupne površine pikova metilnih estera masnih kiselina bez internog standarda [RF], interni standard [ $L_2$ ].

### 7. PRIKAZIVANJE REZULTATA

#### 7.1. Metoda izračuna i formula

7.1.1. Udio eruka kiseline u uzorku, prikazan kao postotak metil erukata u odnosu na ukupan postotak metilnih estera svih masnih kiselina prisutnih u uzorku dobiva se na sljedeći način:

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

pri čemu su

E, EF, RF,  $L_1$  i  $L_2$  površine pikova (6.3.2.), prema potrebi ispravljene uporabom korektivnih faktora.

Za praktične svrhe vrijednost metil erukata dobivena gore navedenom formulom jednaka je količini eruka kiseline izražene kao postotak ukupnih masnih kiselina u uzorku.

7.1.2. Ukoliko su površine pikova dobivene u postotcima, vrijednosti EF-a i RF-a mogu se izračunati na sljedeći način:

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2$$

7.1.3. Metoda izračuna (7.1.1.) pretpostavlja da je udio tetrakozanske kiseline u uzorku zanemariv. Ukoliko se pokaže da je navedena kiselina u uzorku prisutna u značajnoj količini, vrijednost tetrakozanske kiseline ( $L_2$ ) dobivene iz kromatograma frakcija koje sadrže ostatak metilnih estera masnih kiselina mora se smanjiti na:

$$L_2 - T_2,$$

pri čemu je

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

a

$T_2$  – površina pika metil tetrakozanoata dobivena iz uzorka koja čini dio površine vrijednosti internog standarda u kromatogramu preostale frakcije metilnih estera masnih kiselina,

$P_2$  – površina pika metil palmitata dobivena iz kromatograma preostale frakcije,

$T_0$  – površina pika metil tetrakozanoata dobivena iz kromatograma metilnih estera ukupnih masnih kiselina utvrđenih analizom iz članka 4. ovoga Pravilnika,

$P_0$  – površina pika metil palmitata dobivena iz kromatograma metilnih estera ukupnih masnih kiselina utvrđenih analizom iz članka 4. ovoga Pravilnika.

#### 7.1.4. Izvođenje formule

Odnos masnih kiselina u frakciji koja sadrži metil erukat, izražen kao postotak ukupnih masnih kiselina u uzorku dobiva se na sljedeći način:

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

Udio eruka kiseline, u frakciji koja sadrži metil erukat, dobiva se na sljedeći način:

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

Udio eruka kiseline u uzorku izražava se kao postotak ukupnih masnih kiselina na sljedeći način:

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

#### 7.1.5. Ponovljivost

Razlika između vrijednosti dvaju određivanja koja se provode istovremeno ili odmah jedno iza drugoga na istom uzorku, od strane istog analitičara te pod istim uvjetima, ne smije preći 10% rezultata ili 0,5 g na 100 g uzorka, uzimajući u obzir višu vrijednost.

*Slika*

TIPIČAN TANKOSLOJNI KROMATOGRAM KOJI POKAZUJE ODVAJANJE METIL ERUKATA, METIL CETOLEATA I TRANS-IZOMERA DOKOZENSKJE KISELINE

Metil esteri zasićenih masnih  
kiselina

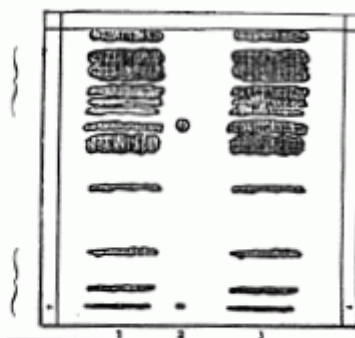
Trans izomeri

Metil erukat<sup>2</sup>

Metil cetoleat

Drugi monoeni

Dieni i polieni



1. uzorak

2. metil erukat

3. uzorak + metil erukat