394R0086

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 86/94

av den 19 januari 1994

om införande av en referensmetod för bestämning av sitosterol och stigmasterol i smör

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT DENNA FÖRORDNING

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets förordning (EEG) nr 804/68 av den 27 juni 1968 om den gemensamma organisationen av marknaden för mjölk och mjölkprodukter[1], senast ändrad genom förordning (EEG) nr 2071/92[2], särskilt artikel 6.7 i denna, och

med beaktande av följande:

Smör kan spåras och de spårade produkterna måste kontrolleras i enlighet med artiklarna 3 och 6 i kommissionens förordning (EEG) nr 570/88[3], senast ändrad genom förordning (EG) nr 3049/93[4].

För att förhindra otillåten användning av subventionerat smör är det viktigt att kraven i samband med spårning av smör ovillkorligen uppfylls.

Med hänsyn till vikten av spårningen för att detta system skall fungera korrekt är det nödvändigt att fastställa gemensamma metoder för påvisning av samtliga spårämnen som krävs enligt detta system och att metoderna tillämpas på samma sätt inom hela gemenskapen. Detta skulle bland annat säkerställa lika behandling av samtliga aktörer som har tillgång till detta system samt undanröja ojämlika konkurrensförhållanden som för närvarande kan förekomma till följd av tillämpningen av olika nationella analysmetoder.

En referensmetod för bestämning av stigmasterol och sitosterol i smörolja har fastställts genom kommissionens förordning (EEG) nr 3942/92[5]. Denna metod kan tillämpas i något ändrad form för bestämning av sterolspårämnen i smör.

Metodens noggrannhet och toleransgränser måste bestämmas.

De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från Förvaltningskommittén för mjölk och mjölkprodukter.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Den referensmetod för analys som skall tillämpas för bestämning av innehållet av stigmasterol eller β-sitosterol i smör i enlighet med artikel 6 i förordning (EEG) nr 570/88 anges i bilagan.

Smör har spårats på ett korrekt sätt om de erhållna resultaten överensstämmer med de krav som anges i punkt 8 i bilagan till den här förordningen.

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den tredje dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

Den skall tillämpas från och med den 1 april 1994.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.

Utfärdad i Bryssel den 19 januari 1994.

På kommissionens vägnar

René STEICHEN

Ledamot av kommissionen

(1) EGT nr L 148, 28.6.1968, s. 13.
(2) EGT nr L 215, 30.7.1992, s. 64.
(3) EGT nr L 55, 1.3.1988, s. 31.
(4) EGT nr L 273, 5.11.1993, s. 7.
(5) EGT nr L 399, 31.12.1992, s. 29.

BILAGA

BESTÄMNING AV SITOSTEROL ELLER STIGMASTEROL I SMÖR GENOM GASKROMATOGRAFI MED KAPILLÄRKOLONN

1. RÄCKVIDD OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Metoden utgörs av ett förfarande för kvantitativ bestämning av sitosterol eller stigmasterol i smör. Med sitosterol avses summan av β-sitosterol och 22-dihydro-β-sitosterol, andra sitosteroler anses vara utan betydelse. Metoden skall tillämpas på prover som tagits i enlighet med förordning (EEG) nr 570/88.

2. PRINCIP

Smöret förtvålas med kaliumhydroxid i en etanollösning och de icke-förtvålningsbara beståndsdelarna extraheras med dietyleter.

Sterolerna omvandlas till trimetylsilyletrar och analyseras genom gaskromatografi i en kapillärkolonn med betulin som intern standard.

3. UTRUSTNING

3.1. En 150 ml kolv till förtvålning med återloppskylare med inslipade anslutningar.

3.2. 500 ml separertratt.

3.3. 250 ml kolvar.

3.4. Tryckutjämningskärl, 250 ml eller motsvarande, för att samla upp överbliven dietyleter.

3.5. Glaskolonn, 350 mm × 20 mm med insmält filterplatta.

3.6. Vattenbad eller värmemantel.

3.7. Reaktionskärl, 2 ml.

3.8. Gaskromatograf lämplig för kapillärkolonn med splitinjektor bestående av:

3.8.1. termostatstyrd kolonnugn som kan hålla den önskade temperaturen ± 1 °C.

3.8.2. injektorblock med temperaturinställning,

3.8.3. flamjonisationsdetektor och signalförstärkare,

3.8.4. integratorskrivare som kan användas tillsammans med signalförstärkaren (3.8.3).

3.9. Kapillärkolonn i kvartsglas helt belagd med BP1 eller motsvarande beläggning med en enhetlig tjocklek av 0,25 µm. Kolonnen skall kunna separera trimetylsilylderivat av lanosterol och sitosterol; en BP1-kolonn som är 12 m lång med en inre diameter på 0,2 mm är lämplig.

3.10. En 1 µl mikrospruta för gaskromatografi med härdad nål.

4. REAGENSER

Alla reagenser skall vara av för analytiska ändamål godkänd klass. Vattnet skall vara destillerat vatten eller vatten med minst motsvarande renhetsgrad.

4.1. Etanol med en lägsta renhetsgrad av 95 %.

4.2. Kaliumhydroxid, 60-procentig lösning: lös 600 g kaliumhydroxid (minst 85 %) i vatten och späd med vatten till 1 liter.

4.3. Betulin med en lägsta renhetsgrad av 99 %.

4.3.1. Intern standardlösning. Betulin i dietyleter (4.4).

4.3.1.1. Betulinlösning som används vid bestämning av sitosterol skall ha koncentrationen 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. Betulinlösning som används vid bestämning av stigmasterol skall ha koncentrationen 0,4 mg/ml.

4.4. Analytiskt ren dietyleter (fri från peroxider och återstod).

4.5. Natriumsulfat, vattenfritt granulat som torkats vid 102 °C i två timmar.

4.6. Silyleringsreagens, t.ex. TRI-SIL (kan beställas från Pierce Chemical Co., katalognr: 49001) eller motsvarande. (VARNING: TRI-SIL är lättantändligt, frätande, giftigt och möjligen cancerogent. Laboratoriepersonal skall ha kännedom om säkerhetsbestämmelserna för TRI-SIL och vidta lämpliga försiktighetsåtgärder.)

4.7. Lanosterol.

4.8. Sitosterol, med en fastställd lägsta renhetsgrad av 90 % (P).

Anmärkning 1: Renhetsgraden hos standardämnen som används för kalibrering skall bestämmas genom tillämpning av standardiseringsprincipen. Antag att alla steroler som finns i provet finns representerade på kromatogrammet, att topparnas totala area representerar 100 % av sterolbeståndsdelarna och att sterolerna ger samma detektorrespons. Systemets linjäritet skall kontrolleras för de aktuella koncentrationsområdena.

4.8.1. Standardlösning av sitosterol - bered en lösning som med 0,001 mg/ml noggrannhet innehåller ca 0,5 mg/ml (W_1) sitosterol (4.8) i dietyleter (4.4).

4.9. Stigmasterol med en fastställd lägsta renhetsgrad av 90 % (P).

4.9.1. Standardlösning av stigmasterol - bered en lösning som med 0,001 mg/ml noggrannhet innehåller ca 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterol (4.9) i dietyleter (4.4).

4.10. Lösning för kontroll av upplösningsförmågan. Bered en lösning som innehåller 0,05 mg/ml lanosterol (4.7) och 0,5 mg/ml sitosterol (4.8) i dietyleter (4.4).

5. FÖRFARANDE

5.1. Beredning av standardlösningar för kromatografi. Den interna standardlösningen (4.3.1) skall tillsättas den aktuella sterolstandardlösningen samtidigt som den tillsätts det förtvålade provet (se 5.2.2).

5.1.1. Sitosterolstandardlösning för kromatografi: överför 1 ml sitosterolstandardlösning (4.8.1) till vart och ett av de två reaktionskärlen (3.7) och avlägsna dietyletern med en kväveström. Tillsätt 1 ml intern standardlösning (4.3.1.1) och avlägsna dietyletern med en kväveström.

5.1.2. Stigmasterolstandardlösning för kromatografi: överför 1 ml stigmasterolstandardlösning (4.9.1) till vart och ett av de två reaktionskärlen (3.7) och avlägsna dietyletern med en kväveström. Tillsätt 1 ml intern standardlösning (4.3.1.2) och avlägsna dietyletern med en kväveström.

5.2. Beredning av icke-förtvålbara beståndsdelar

5.2.1. Smält smörprovet vid en temperatur på högst 35 °C. Blanda provet noggrant genom omrörning.

Väg med 1 mg noggrannhet upp ca 1 g smör (W_2) i en 150 ml kolv (3.1). Tillsätt 50 ml etanol (4.1) och 10 ml kaliumhydroxidlösning (4.2). Montera återloppskylaren och värm till ca 75 °C i 30 minuter. Avlägsna kylaren och kyl kolven till omkring rumstemperatur.

5.2.2. Tillsätt 1,0 ml intern standardlösning (4.3.1.1) i kolven om det är sitosterol som skall bestämmas, eller (4.3.1.2) om det är stigmasterol som skall bestämmas. Blanda väl. Överför kolvens innehåll kvantitativt till en 500 ml separertratt (3.2) och skölj kolven med 50 ml vatten och 250 ml dietyleter (4.4). Skaka separertratten kraftigt i två minuter och låt faserna separera. Den nedre vattenhaltiga fasen tappas av och eterfasen tvättas genom att tratten skakas fyra gånger med 100 ml vatten vardera.

Anmärkning 2: För att undvika att en emulsion bildas är det viktigt att de två första vattentvättningarna utförs försiktigt (tratten vänds tio gånger). Vid tredje tvättningen kan tratten skakas kraftigt i 30 sekunder. Om en emulsion bildas kan den brytas ned genom tillsats av 5–10 ml etanol. Om etanol tillsätts, är det viktigt att utföra ytterligare två grundliga tvättningar med vatten.

5.2.3. Den klara, tvålfria eterfasen får passera en glaskolonn (3.5) som innehåller 30 g vattenfritt natriumsulfat (4.5). Etern uppsamlas i en 250 ml kolv (3.3). Tillsätt en koksten och förånga etern nästan helt i vattenbad eller med värmemantel och samla noggrant upp resterande lösningsmedel.

Anmärkning 3: Om provextrakt förångas fullständigt vid för hög temperatur kan sterolförlust förekomma.

5.3. Beredning av trimetylsilyletrar

5.3.1. Överför den resterande eterlösningen i kolven till ett 2 ml reaktionskärl (3.7) med 2 ml dietyleter och avlägsna etern med en kväveström. Skölj kolven ytterligare två gånger med 2 ml dietyleter vardera. Innehållet överförs varje gång till reaktionskärlet och etern förångas med kväve.

5.3.2. Provet silyleras genom tillsats av 1 ml TRI-SIL (4.6). Förslut kärlet och skaka kraftigt så att provet löses. Om det inte löses fullständigt genom skakning, värm till 65–70 °C. Låt stå i minst fem minuter innan det sprutas in i gaskromatografen. Silylera standardlösningarna på samma sätt som provet. Silylera lösningen för kontroll av upplösningsförmågan (4.10) på samma sätt som proven.

Anmärkning 4: Silylering skall ske i vattenfri miljö. Ofullständig silylering av betulin indikeras av en andra topp intill betulinets topp.

Förekomst av etanol kommer att påverka silyleringen. Om tvättningen i extraktionsskedet är otillräcklig kan detta problem uppstå. Om problemet kvarstår kan en femte tvättning göras under extraktionen varvid reaktionskärlet skakas kraftigt i 30 sekunder.

5.4. Gaskromatografisk analys

5.4.1. Kromatografiförhållanden

Installera gaskromatografen enligt bruksanvisningen.

Riktlinjerna för kromatografins utförande är följande:

— kolonntemperatur	265 °C
— injektortemperatur	280 °C
— detektortemperatur	300 °C
— bärargasens flödeshastighet	0,6 ml/minut
— vätets tryck	84 kPa
— lufttryck	155 kPa

— splitsystemet ställs in på mellan 10:1 och 50:1 och optimeras i enlighet med bruksanvisningen, varefter detektorresponsens linjäritet kontrolleras inom de aktuella koncentrationsområdena.

Anmärkning 5: Det är särskilt viktigt att injektorsatsen rengörs regelbundet.

— Insprutad mängd: 1 µl trimetylsilyleterlösning.

Systemet skall vara i jämvikt och responsen stabil innan analysen påbörjas.

Dessa förhållanden kan varieras om särskilda egenskaper hos kolonnen och gaskromatografen gör det nödvändigt för att erhålla kromatogram som uppfyller följande krav:

— sitosteroltoppen skall vara tydligt skild från lanosteroltoppen. Figur 1 visar hur ett typiskt kromatogram av en silylerad lösning för kontroll av upplösningsförmågan (4.10) skall se ut,

— den relativa retentionstiden för följande steroler bör vara ungefär

kolesterol	1,0
stigmasterol	1,3
sitosterol	1,5
betulin	2,5

— retentionstiden för betulin bör vara ungefär 24 minuter.

5.4.2. Analysförfarande

Injicera 1 µl silylerad standardlösning (stigmasterol eller sitosterol) och justera integratorns kalibreringsparametrar.

Injicera ytterligare 1 µl silylerad standardlösning för bestämning av responsfaktorerna med betulin som intern standard.

Injicera 1 µl silylerad provlösning och mät topparnas areor. Varje kromatografisk serie skall inledas och avslutas med insprutning av standardlösningar.

Som regel bör en standardlösning insprutas efter varje serie om sex insprutningar av provlösning.

Anmärkning 6: Integrering av stigmasteroltoppen bör inbegripa eventuell svansning enligt definition i punkterna 1, 2 och 3 i figur 2b.

Integrering av sitosteroltoppen bör inbegripa toppen för 22-dihydro-β-sitosterol (stigmastanol) som eluerar omedelbart efter sitosterol, se figur 3b, när den totala kvantiteten sitosterol bestäms.

6. BERÄKNING AV RESULTAT

6.1. Bestäm arean för steroltopparna och betulintopparna i båda referenskromatogrammen kring en serie och beräkna R_1 på följande sätt:

$$R_1 = \frac{\text{Genomsnittlig toppareal för sterol i standardlösning}}{\text{Genomsnittlig toppareal för betulin i standardlösning}}$$

Bestäm arealen för steroltoppen (stigmasterol eller sitosterol) och betulintoppen i provet och beräkna R_2 på följande sätt:

$$R_2 = \frac{\text{Toppareal för sterol i provet}}{\text{Toppareal för betulin i provet}}$$

W_1 = Mängden sterol (mg) i 1 ml standardlösning (4.8.1 eller 4.9.1).

W_2 = Provets vikt (g) (5.2.1).

P = Standardsterolens renhetsgrad (4.8 eller 4.9).

$$\text{Mängden sterol i provet (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10.$$

7. METODENS NOGGRANNHET

7.1. Repeterbarhet

7.1.1. Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som inom kortast möjliga tidsintervall utförts av samma kemist med användning av samma utrustning på identiskt lika prover får inte överstiga 19,3 mg/kg.

7.1.2. Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som inom kortast möjliga tidsintervall utförts av samma kemist med användning av samma utrustning på identiskt lika prover får inte överstiga 23,0 mg/kg.

7.2. Reproducerbarhet

7.2.1. Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som utförts av kemister i olika laboratorier med användning av olika utrustningar på identiskt lika prover får inte överstiga 31,9 mg/kg.

7.2.2. Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som utförts av kemister i olika laboratorier med användning av olika utrustningar på identiskt lika prover får inte överstiga 8,7 % av genomsnittet av resultaten.

7.3. Källa till precisionsdata

Precisionsdata bestämdes genom ett experiment som utfördes 1992 i åtta olika laboratorier med sex prover (tre dubbla blindtester) för stigmasterol och med sex prover (tre dubbla blindtester) för sitosterol.

8. TOLERANSGRÄNSER

8.1. Tre prover skall tas från produkten med tillsats av spårämne för att kontrollera homogeniteten.

8.2. Stigmasterol

8.2.1. 150 g stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 % iblandas per ton smör, dvs. 142,5 mg/kg, eller 170 g stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 % per ton smör, dvs. 144,5 mg/kg.

8.2.2. Med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % (CrD_{95}) skall genomsnittet av de tre resultaten inte understiga

— 126,0 mg/kg vid iblandning av stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %,

— 128,0 mg/kg vid iblandning av stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 %.

8.2.3. Utöver de kriterier som anges ovan används det lägsta analysresultatet för produkten för kontroll av att spårämnet är jämnt fördelat. Detta sker genom en jämförelse med följande gränser:

— 116,4 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 % med konventionellt konfidensintervall [ISO CrD_{95}]),

— 118,3 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 % med konventionellt konfidensintervall [ISO CrD_{95}]),

— 95,1 mg/kg (80 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 % med konventionellt konfidensintervall [ISO CrD_{95}]),

— 96,7 mg/kg (80 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 % med konventionellt konfidensintervall [ISO CrD_{95}]).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan antingen 116,4 mg/kg och 95,1 mg/kg eller 118,3 mg/kg och 96,7 mg/kg.

8.3. Sitosterol

8.3.1. 600 g sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 % iblandas per ton smör, dvs. 540 mg/kg.

8.3.2. Med ett konventionellt konfidensintervall (CrD_{95}) skall genomsnittet av de tre resultaten inte understiga 514,4 mg/kg.

8.3.3. Utöver kriterierna i 8.3.2 används det lägsta analysresultatet för produkten till att kontrollera att spårämnet är jämnt fördelat. Detta görs genom en jämförelse med följande gränser:

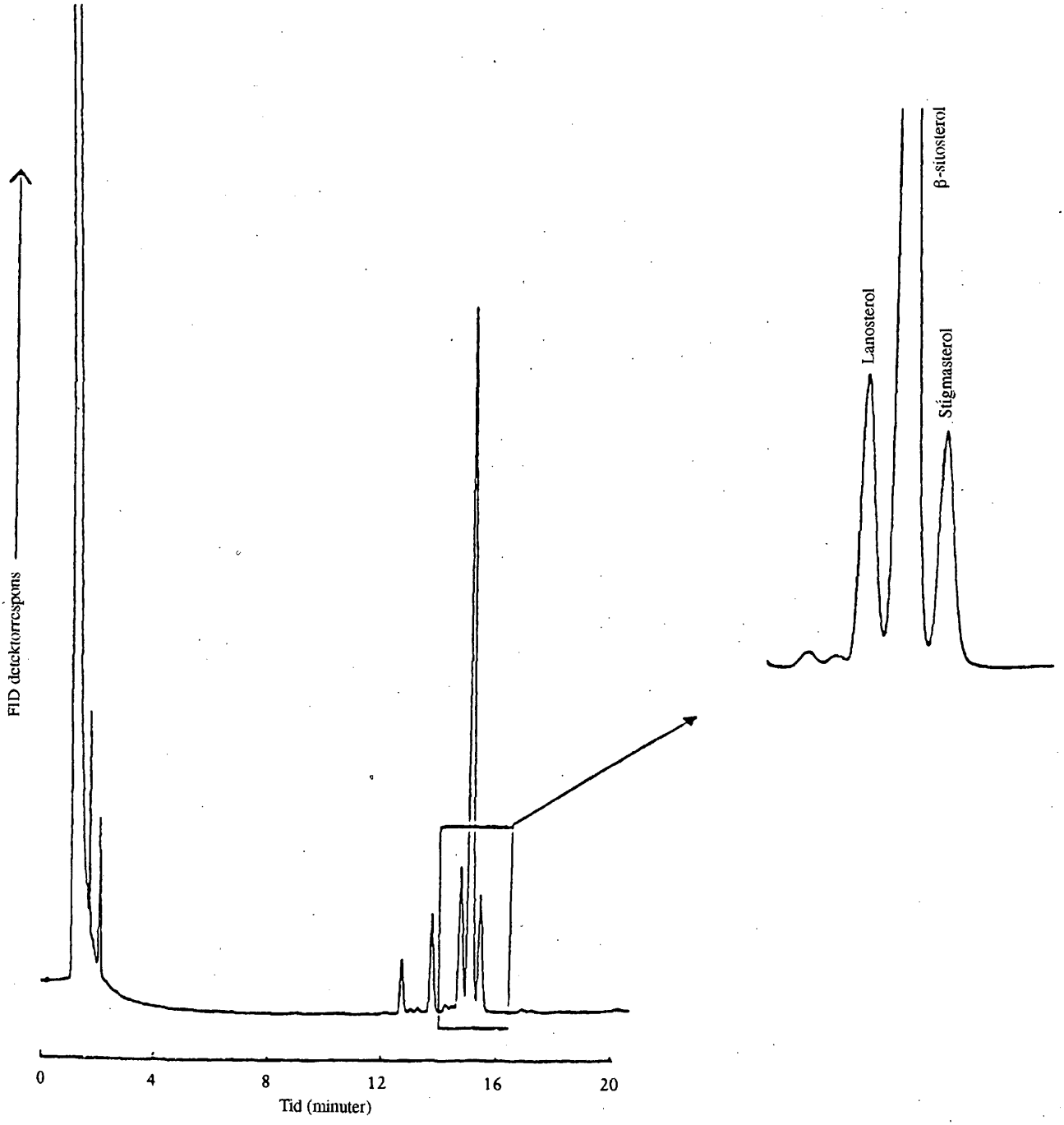
— 485,1 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 % med konventionellt konfidensintervall (ISO CrD_{95})).

— 404,1 mg/kg (80 % av den minsta tillåtna iblandningen för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 % med konventionellt konfidensintervall (ISO CrD_{95})).

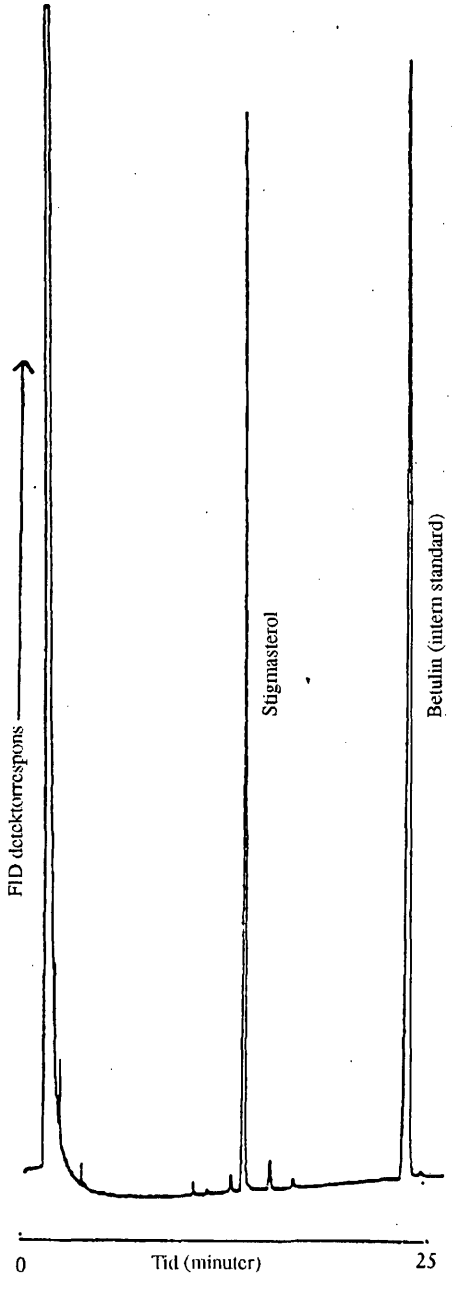
Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 485,1 mg/kg och 404,1 mg/kg.

Figur 1 Kromatogram av upplösning för kontroll av upplösningsförmåga

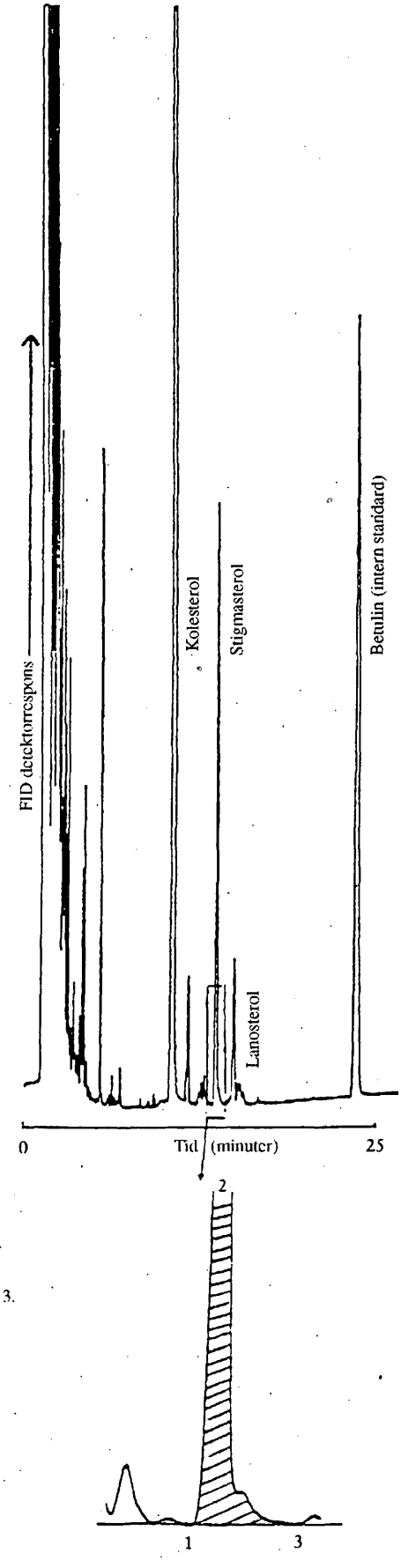
Det bästa är om topparna är helt åtskilda, dvs. att linjen för lanosteroltoppen går ner till baslinjen innan den går upp till sitosteroltoppen. En viss ofullständighet kan tolereras.



Figur 2a
Stigmasterolstandard

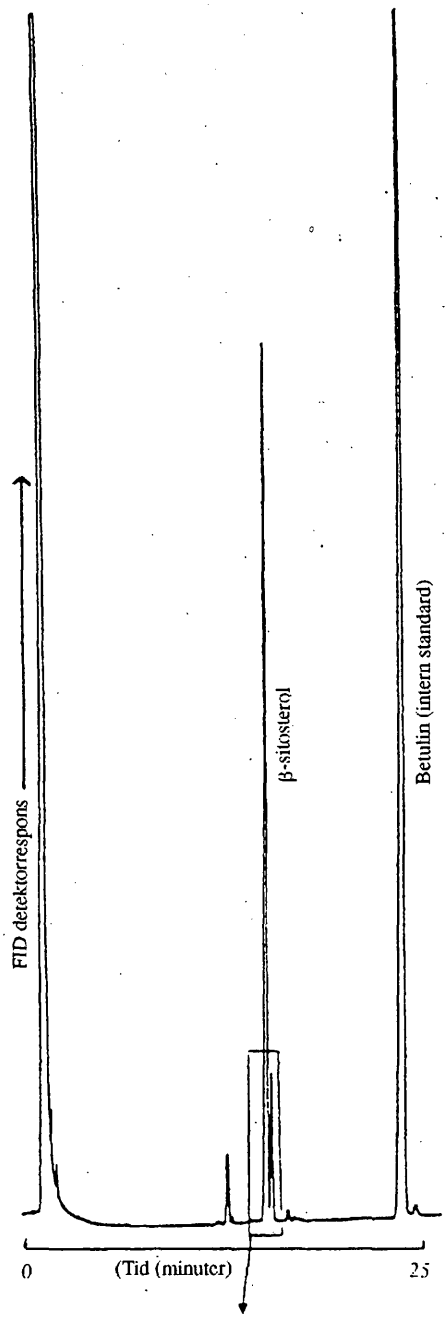


Figur 2b
Smörprov denaturerat med stigmasterol

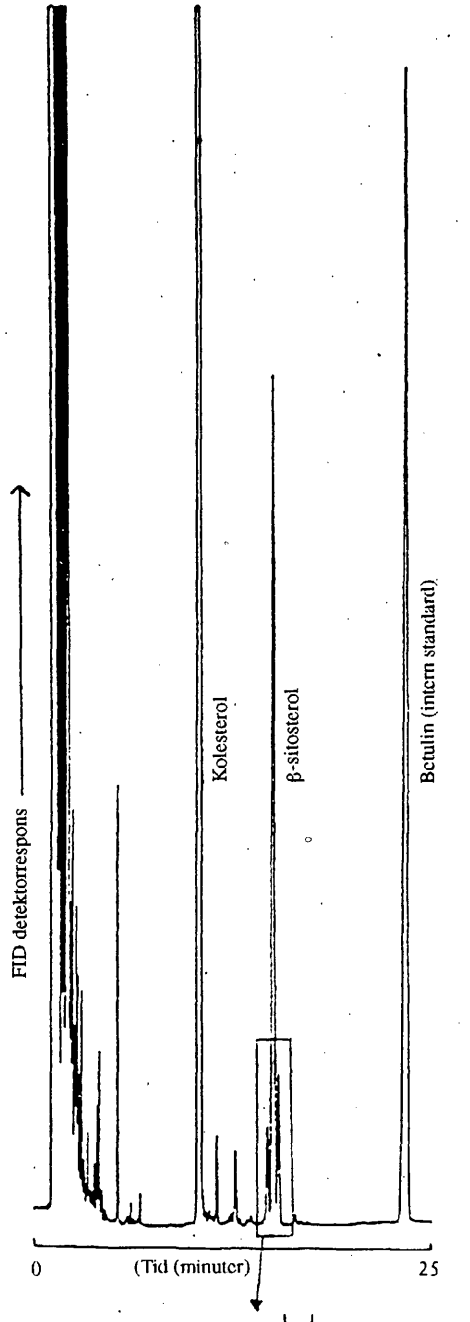


Anmärkning: Integrering av stigmasteroltoppen bör inbegripa eventuell svansning som avgränsas av punkterna 1, 2 och 3.

Figur 3a
Sitosterolstandard



Figur 3b
Smörprov denaturerat
med β-sitosterol



Anmärkning : β-sitosterol innehåller ofta en orenhet (identifierad som stigmastanol) som eluerar omedelbart efter β-sitosterol. Dessa två toppars arealer bör adderas vid bestämning av det totala innehållet av β-sitosterol.