VERORDNUNG (EG) Nr. 86/94 DER KOMMISSION

vom 19. Januar 1994

zur Erstellung einer Referenzmethode für die Bestimmung von Sitosterin und Stigmasterin in Butter

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung (EWG) Nr. 804/68 des Rates vom 27. Juni 1968 über die gemeinsame Marktorganisation für Milch und Milcherzeugnisse [1], zuletzt geändert durch die Verordnung (EWG) Nr. 2071/92 [2], insbesondere auf Artikel 6 Absatz 7,

in Erwägung nachstehender Gründe:

Gemäß den Artikeln 3 und 6 der Verordnung (EWG) Nr. 570/88 der Kommission [3], zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 3049/93 [4], kann Butter gekennzeichnet werden und müssen die gekennzeichneten Erzeugnisse kontrolliert werden.

Damit eine unzulässige Verwendung subventionierter Butter ausgeschlossen ist, sind die Bedingungen hinsichtlich der Markierung mit Kennzeichnungsstoffen genauestens zu erfüllen.

Wegen der Bedeutung der Markierung mit Kennzeichnungsstoffen für das Funktionieren dieser Regelungen bedarf es gemeinsamer Verfahren für den Nachweis sämtlicher Kennzeichnungsstoffe; diese Verfahren sollten gemeinschaftsweit einheitlich angewendet werden. Dies dient insbesondere der Gleichbehandlung aller diese Regelung in Anspruch nehmenden Marktteilnehmer und der Beseitigung etwaiger Wettbewerbsverzerrungen als Folge der gegenwärtig von Mitgliedstaat zu Mitgliedstaat unterschiedlichen Analyseverfahren.

Mit der Verordnung (EWG) Nr. 3942/92 der Kommission [5] wurde eine Referenzmethode zur Bestimmung von Stigmasterin und Sitosterin in Butterfett festgelegt. Diese Methode kann in leicht abgewandelter Form auch zur Bestimmung von Sterinkennzeichnungsstoffen in Butter verwendet werden.

Es sollten die Genauigkeit der Methode und die zulässigen Abweichungen bestimmt werden.

Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Verwaltungsausschusses für Milch und Milcherzeugnisse —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Die zur Bestimmung des Stigmasteringehalts oder β-Sitosteringehalts von Butter nach Artikel 6 der Verordnung (EWG) Nr. 570/88 anzuwendende Referenzmethode ist im Anhang beschrieben.

Butter ist dann korrekt gekennzeichnet worden, wenn die Ergebnisse den Anforderungen gemäß Punkt 8 dieses Anhangs genügen.

Artikel 2

Diese Verordnung tritt am dritten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Diese Verordnung gilt ab 1. April 1994.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 19. Januar 1994

Für die Kommission

René STEICHEN

Mitglied der Kommission

(1) ABl. Nr. L 148 vom 28. 6. 1968, S. 13.
(2) ABl. Nr. L 215 vom 30. 7. 1992, S. 64.
(3) ABl. Nr. L 55 vom 1. 3. 1988, S. 31.
(4) ABl. Nr. L 273 vom 5. 11. 1993, S. 7.
(5) ABl. Nr. L 399 vom 31. 12. 1992, S. 29.

ANHANG

BESTIMMUNG VON SITOSTERIN BZW. STIGMASTERIN IN BUTTERFETT DURCH KAPILLARSÄULEN-GASCHROMATOGRAPHIE

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Die Methode beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Sitosterin bzw. Stigmasterin in Butterfett. Sitosterin ist dabei die Summe von β-Sitosterin und 22-Dihydro-β-Sitosterin ; die anderen Sitosterine sind als unbedeutend zu betrachten. Die Methode ist auf Proben anwendbar, die gemäß der Verordnung (EWG) Nr. 570/88 entnommen wurden.

2. PRINZIP

Die Butter wird mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung verseift. Die unverseifbaren Bestandteile werden mit Diethyl-Ether extrahiert.

Die Sterine werden zu Trimethyl-Silyl-Ether derivatisiert und durch Kapillarsäulen-Gaschromatographie mit Betulin als internem Standard analysiert.

3. GERÄTE

3.1. 150-ml-Verseifungskolben mit Rückflußkühler und Schliffverbindungen.

3.2. 500-ml-Scheidetrichter.

3.3. 250-ml-Kolben.

3.4. Druckausgleichtrichter (etwa 250 ml) zum Auffangen von überschüssigem Diethyl-Ether.

3.5. Glassäule, 350 mm × 20 mm, mit Sinterglasfritte.

3.6. Wasserbad oder Heizhaube.

3.7. Reagenzgläser, 2 ml.

3.8. Zur Verwendung mit einer Kapillarsäule geeigneter Gaschromatograph, ausgerüstet mit einem „Split-System" und folgenden Bestandteilen :

3.8.1. ein Säulenofen, der die gewünschte Temperatur mit einer Genauigkeit von ± 1 °C halten kann ;

3.8.2. ein Probeneinlaßsystem mit verstellbarer Temperatur ;

3.8.3. ein Flammenionisationsdetektor und ein Signal-Verstärker ;

3.8.4. ein Aufzeichnungsgerät mit Integrator für den Signal-Verstärker (3.8.3).

3.9. Eine Quarzglas(Fused Silica)-Kapillarsäule, vollständig beschichtet mit BP1 oder einem vergleichbaren Material mit einer einheitlichen Stärke von 0,25 µm. Die Säule muß die Trimethyl-Silyl-Derivate von Lanosterin und Sitosterin trennen können. Geeignet ist eine mit BP1 beschichtete Säule von 12 m Länge und 0,2 mm Innendurchmesser.

3.10. Eine 1-µl-Gaschromatographie-Mikrospritze mit gehärteter Nadel.

4. REAGENZIEN

Alle Reagenzien müssen von anerkannter Analysenqualität sein. Es ist destilliertes Wasser oder Wasser von mindestens gleichem Reinheitsgrad zu verwenden.

4.1. Ethanol, Reinheitsgrad mindestens 95 %.

4.2. 60 %ige Kaliumhydroxid-Lösung (600 g Kaliumhydroxid (mindestens 85 %) in Wasser lösen und bis zu einem Liter mit Wasser auffüllen).

4.3. Betulin, Reinheitsgrad mindestens 99 %.

4.3.1. Interne Standardlösungen. Betulin in Diethyl-Ether (4.4).

4.3.1.1. Die zur Bestimmung von Sitosterin verwendete Betulinlösung soll eine Konzentration von 1,0 mg/ml aufweisen.

4.3.1.2. Die zur Bestimmung von Stigmasterin verwendete Betulinlösung soll eine Konzentration von 0,4 mg/ml aufweisen.

4.4. Diethyl-Ether, analyserein (frei von Peroxiden oder Rückständen).

4.5. Natriumsulfat, wasserfrei, granular, zuvor 2 Stunden lang bei 102 °C getrocknet.

4.6. Silylierungs-Reagenz, z. B. TRI-SIL (erhältlich von Pierce Chemical Co., Kat.-Nr. 49001) oder vergleichbares Reagenz. (Achtung: TRI-SIL ist entflammbar, giftig, ätzend und ein potentielles Kanzerogen. Das Laborpersonal muß mit den Sicherheitsdaten zu TRI-SIL vertraut sein und die erforderlichen Vorsichtsmaßregeln treffen.)

4.7. Lanosterin.

4.8. Sitosterin, bekannter Reinheitsgrad mindestens 90 % (P).

Anmerkung 1: Die Reinheit der Standardstoffe für die Eichung ist durch Normalisierung zu bestimmen. Dazu wird angenommen, daß das Chromatogramm alle in der Probe vorhandenen Sterine wiedergibt, daß die Gesamtfläche der Peaks 100 % der Sterinbestandteile darstellt und daß alle Sterine ein gleich starkes Detektorsignal hervorrufen. Es ist sicherzustellen, daß das System in den interessierenden Konzentrationsbereichen linear verläuft.

4.8.1. Sitosterin-Standardlösung: Lösung von Sitosterin (4.8) in Diethyl-Ether (4.4) mit einer Konzentration von rund 0,5 mg/ml, auf 0,001 mg/ml genau (W_1).

4.9. Stigmasterin, bekannter Reinheitsgrad mindestens 90 % (P).

4.9.1. Stigmasterin-Standardlösung: Lösung von Stigmasterin (4.9) in Diethyl-Ether (4.4) mit einer Konzentration von rund 0,2 mg/ml, auf 0,001 mg/ml genau (W_1).

4.10. Testlösung für die Prüfung der Auflösung: Lösung von Lanosterin (4.7) (0,05 mg/ml) und Sitosterin (4.8) (0,5 mg/ml) in Diethyl-Ether (4.4).

5. AUSFÜHRUNG

5.1. Herstellung der Standardlösungen für die Chromatographie. Die interne Standardlösung (4.3.1) muß der entsprechenden Sterin-Standardlösung und der verseiften Probe gleichzeitig zugesetzt werden (siehe 5.2.2).

5.1.1. Sitosterin-Standardlösung für die Chromatographie: je 1 ml der Sitosterin-Standardlösung (4.8.1) in 2 Reagenzgläser (3.7) überführen und den Diethyl-Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen. 1 ml der internen Standardlösung (4.3.1.1) zugeben und den Diethyl-Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen.

5.1.2. Stigmasterin-Standardlösung für die Chromatographie: je 1 ml der Stigmasterin-Standardlösung (4.9.1) in 2 Reagenzgläser (3.7) überführen und den Diethyl-Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen. 1 ml der internen Standardlösung (4.3.1.2) zugeben und den Diethyl-Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen.

5.2. Vorbereitung der unverseifbaren Bestandteile.

5.2.1. Die Butterprobe bei höchstens 35 °C schmelzen lassen. Die Probe durch Rühren gründlich durchmischen. Ungefähr 1 g Butterfett (W_2) auf 1 mg genau in einen 150-ml-Kolben (3.1) einwiegen. 50 ml Ethanol (4.1) und 10 ml Kaliumhydroxid-Lösung (4.2) zugeben. Rückflußkühler anbringen und 30 Minuten auf rund 75 °C erhitzen. Kühler entfernen und den Kolben auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

5.2.2. 1,0 ml der internen Standardlösung (4.3.1.1 bei der Bestimmung von Sitosterin bzw. 4.3.1.2 bei der Bestimmung von Stigmasterin) in den Kolben geben. Gründlich mischen. Den Inhalt des Kolbens quantitativ in einen 500-ml-Scheidetrichter (3.2) überführen, in dem man den Kolben nacheinander mit 50 ml Wasser und 250 ml Diethyl-Ether (4.4) ausspült. Den Scheidetrichter 2 Minuten kräftig schütteln und Trennung der Phasen abwarten. Die untere Wasserschicht ablaufen lassen und die Etherschicht viermal mit je 100 ml Wasser ausschütteln.

Anmerkung 2: Damit keine Emulsion entsteht, ist es wichtig, die ersten beiden Waschvorgänge mit Wasser vorsichtig auszuführen (10 Drehungen). Beim dritten Waschvorgang kann 30 Sekunden lang kräftig geschüttelt werden. Sollte sich eine Emulsion bilden, so kann diese durch Zugabe von 5—10 ml Ethanol zerstört werden. Bei Zugabe von Ethanol muß unbedingt noch weiter zweimal kräftig mit Wasser ausgeschüttelt werden.

5.2.3. Die klare seifenfreie Etherschicht durch eine Glassäule (3.5) mit 30 g wasserfreiem Natriumsulfat (4.5) laufen lassen. Den Ether in einem 250-ml-Kolben (3.3) auffangen. Siedesteinchen zugeben und auf einem Wasserbad oder einer Heizhaube fast bis zur völligen Trockenheit eindampfen lassen; dabei die überschüssigen Lösungsmittel auffangen.

Anmerkung 3: Werden die Probenextrakte bei zu hoher Temperatur vollständig getrocknet, so können Sterine verloren gehen.

5.3. Vorbereitung der Trimethyl-Silyl-Ether.

5.3.1. Die im Kolben verbliebene Etherlösung in ein 2-ml-Reagenzglas (3.7) mit 2 ml Diethyl-Ether übertragen und den Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen. Den Kolben mit 2 weiteren 2-ml-Aliquoten Diethyl-Ether ausspülen, dabei jedes Mal den Inhalt in das Reagenzglas übertragen und den Ether durch einen Stickstoffstrom entfernen.

5.3.2. Die Probe durch Zugabe von 1 ml TRI-SIL (4.6) silylieren. Glas verschließen und zwecks Auflösen kräftig schütteln. Bei unvollständiger Auflösung auf 65—70 °C erwärmen. Vor der Injektion in den Gaschromatographen mindestens 5 Minuten stehen lassen. Die Standards in gleicher Weise wie die Proben silylieren. Die Mischung zur Prüfung der Auflösung (4.10) in gleicher Weise wie die Proben silylieren.

Anmerkung 4: Die Silylierung ist in wasserfreier Umgebung vorzunehmen. Die unvollständige Silylierung von Betulin wird durch einen zweiten Peak dicht neben dem von Betulin angezeigt.

Die Silylierung wird in Gegenwart von Ethanol (ungenügendes Spülen bei der Extraktion) beeinträchtigt. In diesem Fall muß bei der Extraktion ein fünftes Mal gespült werden (30 Sekunden kräftiges Schütteln).

5.4. Gaschromatographische Analyse.

5.4.1. Wahl der Arbeitsbedingungen.

Den Gaschromatographen nach der Anleitung des Herstellers vorbereiten.

Als Leitlinie gelten die folgenden Arbeitsbedingungen:

— Säulentemperatur: 265 °C

— Temperatur des Injektors: 280 °C

— Temperatur des Detektors: 300 °C

— Durchflußgeschwindigkeit des Trägergases: 0,6 ml/min.

— Wasserstoffdruck: 84 kPa

— Luftdruck: 155 kPa

— Splitverhältnis: 10 : 1 bis 50 : 1. Das Splitverhältnis nach der Anleitung des Herstellers optimieren und daraufhin die Linearität des Detektorsignals im interessierenden Konzentrationsbereich überprüfen.

Anmerkung 5: Es ist unbedingt darauf zu achten, daß die Infektionsröhre regelmäßig gereinigt wird.

Menge der eingespritzten Substanz 1 µl TMSE-Lösung.

Vor Beginn jeglicher Analysen warten, bis das System äquilibriert ist und ein zufriedenstellend stabiles Response-Signal liefert.

Diese Bedingungen können je nach Beschaffenheit der Säule und des Gaschromatographen abgewandelt werden, damit Chromatogramme entstehen, die den folgenden Anforderungen genügen:

— Der Sitosterin-Peak muß vom Lanosterin-Peak genügend abgesetzt sein. Abbildung 1 zeigt ein typisches Chromatogramm, wie es aus der silylierten Testlösung zur Prüfung der Auflösung erhalten werden sollte (4.10).

— Die realtiven Retentionszeiten der folgenden Sterine sollten ungefähr betragen:

Cholesterin	1,0
Stigmasterin:	1,3
Sitosterin:	1,5
Betulin:	2,5.

— Die Retentionszeit für Betulin sollte rund 24 Minuten betragen.

5.4.2. Analyseverfahren

1 µl der silylierten Standardlösung (Stigmasterin bzw. Sitosterin) einspritzen und die Parameter für die Eichung des Integrators einstellen.

Nochmals 1 µl der silylierten Standardlösung einspritzen, um die Response-Faktoren in bezug auf Betulin zu bestimmen.

1 µl der silylierten Probelösung einspritzen und Peakflächen messen. Am Anfang und am Ende einer jeden gaschromatographischen Analyse muß die Standardlösung eingespritzt werden. Als Leitlinie sollte nach je 6 Probelösungen die Standardlösung eingespritzt werden.

Anmerkung 6: Bei der Integration des Stigmasterin-Peaks ist auch das durch die Punkte 1, 2 und 3 in Abbildung 2b markierte Tailing mit zu erfassen.

Bei der Integration des Sitosterin-Peaks ist die Fläche des Peaks von 22-Dihydro-β-Sitosterin (Stigmastanin), das unmittelbar nach Sitosterin eluiert wird, mit zu erfassen, wenn das gesamte Sitosterin berechnet werden soll.

6. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

6.1. Die Fläche der Sterin-Peaks und der Betulin-Peaks für die zu Beginn und am Ende eines Durchgangs eingespritzten Standardlösungen bestimmen und R_1 berechnen:

$$R_1 = \frac{\text{durchschnittliche Peakfläche von Sterin im Standard}}{\text{durchschnittliche Peakfläche von Betulin im Standard}}$$

Fläche des Sterin-Peaks (Stigmasterin oder Sitosterin) und des Betulin-Peaks in der Proble bestimmen und R_2 berechnen:

$$R_2 = \frac{\text{Peakfläche von Sterin in der Probe}}{\text{Peakfläche von Betulin in der Probe}}$$

W_1 = Steringehalt des Standards (mg) in 1 ml Standardlösung (4.8.1 oder 4.9.1).

W_2 = Gewicht der Probe (g) (5.2.1).

P = Reinheitsgrad des Standardsterins (4.8 oder 4.9).

$$\text{Steringehalt der Probe (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10.$$

7. GENAUIGKEIT DER METHODE

7.1. Wiederholbarkeit.

7.1.1. Stigmasterin.

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von derselben Person mit denselben Geräten am gleichen Testmaterial so rasch wie möglich nacheinander ausgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 19,3 mg/kg voneinander abweichen.

7.1.2. Sitosterin.

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die von derselben Person mit denselben Geräten am gleichen Testmaterial so rasch wie möglich nacheinander ausgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 23,0 mg/kg voneinander abweichen.

7.2. Vergleichbarkeit.

7.2.1. Stigmasterin.

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die in verschiedenen Labors mit verschiedenen Geräten am gleichen Testmaterial durchgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 31,9 mg/kg voneinander abweichen.

7.2.2. Sitosterin.

Die Ergebnisse zweier Bestimmungen, die in verschiedenen Labors mit verschiedenen Geräten am gleichen Testmaterial durchgeführt worden sind, dürfen um nicht mehr als 8,7 % des Durchschnitts der Bestimmungen voneinander abweichen.

7.3. Quellen der Präzisionsdaten.

Die Präzisionsdaten stammen aus einem 1992 durchgeführten Versuch, an dem 8 Labors beteiligt waren und bei dem 6 Proben (3 Blindproben) auf Stigmasterin und 6 Proben (3 Blindproben) auf Sitosterin untersucht wurden.

8. TOLERANZGRENZEN

8.1. Zur Prüfung der Homogenität sind dem gekennzeichneten Produkt drei Proben zu entnehmen.

8.2. Stigmasterin.

8.2.1. Der Stigmasterinzusatz beträgt 150 g bei mindestens 95 % reinem Stigmasterin je Tonne Butterfett, d. h. 142,5 mg/kg, bzw. 170 g bei mindestens 85 % reinem Stigmasterin je Tonne Butterfett, d. h. 144,5 mg/kg.

8.2.2. Unter Berücksichtigung der kritischen Differenz für einen 95 %-Vertrauensbereich (CrD_{95}-Wert) muß der Durchschnitt der drei Ergebnisse:

— bei Zusatz von 95 % reinem Stigmasterin mindestens 126,0 mg/kg,

— bei Zusatz von 85 % reinem Stigmasterin mindestens 128,0 mg/kg.

betragen.

8.2.3. Neben den obengenannten Kriterien wird das niedrigste bei der Analyse der gekennzeichneten Proben erzielte Ergebnis verwendet, um die homogene Verteilung des Kennzeichnungsmittels zu überprüfen. Dies geschieht durch einen Vergleich mit folgenden Grenzwerten:

— 116,4 mg/kg (95 % der Mindestzusatzmenge bei 95 % reinem Stigmasterin unter Berücksichtigung des CrD_{95}-Wertes für eine Einzelprobe),

— 118,3 mg/kg (95 % der Mindestzusatzmenge bei 85 % reinem Stigmasterin unter Berücksichtigung des CrD_{95}-Wertes für eine Einzelprobe),

— 95,1 mg/kg (80 % der Mindestzusatzmenge bei 95 % reinem Stigmasterin unter Berücksichtigung des CrD_{95}-Wertes für eine Einzelprobe),

— 96,7 mg/kg (80 % der Mindestzusatzmenge bei 85 % reinem Stigmasterin unter Berücksichtigung des CrD_{95}-Wertes für eine Einzelprobe).

Es wird die Konzentration des Kennzeichnungsmittels in der Probe mit dem niedrigsten Ergebnis, das man durch Interpolierung zwischen 116,4 mg/kg und 95,1 mg/kg bzw. zwischen 118,3 mg/kg und 96,7 mg/kg erhält, verwendet.

8.3. Sitosterin.

8.3.1. Der Zusatz von Sitosterin beträgt 600 g bei mindestens 90 % reinem Sitosterin je Tonne Butter, d. h. 540 mg/kg.

8.3.2. Unter Berücksichtigung des CrD_{95}-Wertes muß der Durchschnitt der drei Ergebnisse mindestens 514,4 mg/kg betragen.

8.3.3. Neben den obengenannten Kriterien wird das niedrigste bei der Analyse der gekennzeichneten Proben erzielte Ergebnis verwendet, um die homogene Verteilung des Kennzeichnungsmittels zu überprüfen. Dies geschieht durch einen Vergleich mit folgenden Grenzwerten:

— 485,1 mg/kg (95 % der Mindestzusatzmenge bei 90 % reinem Sitosterin unter Berücksichtigung des CrD_{95}-Wertes für eine Einzelprobe),

— 404,1 mg/kg (80 % der Mindestzusatzmenge bei 90 % reinem Sitosterin unter Berücksichtigung des CrD_{95}-Wertes für eine Einzelprobe).

Es wird die Konzentration des Kennzeichnungsmittels in der Probe mit dem niedrigsten Ergebnis, das man durch Interpolierung zwischen 485,1 mg/kg und 404,1 mg/kg erhält, verwendet.

Abbildung 1 Chromatogramm der Mischung zur Prüfung der Auflösung

Wünschenswert ist eine vollständige Auflösung, d. h. die Peaks für Lanosterin und Sitosterin sollten vollständig zur Grundlinie zurückkehren. Eine unvollständige Auflösung ist jedoch zulässig.

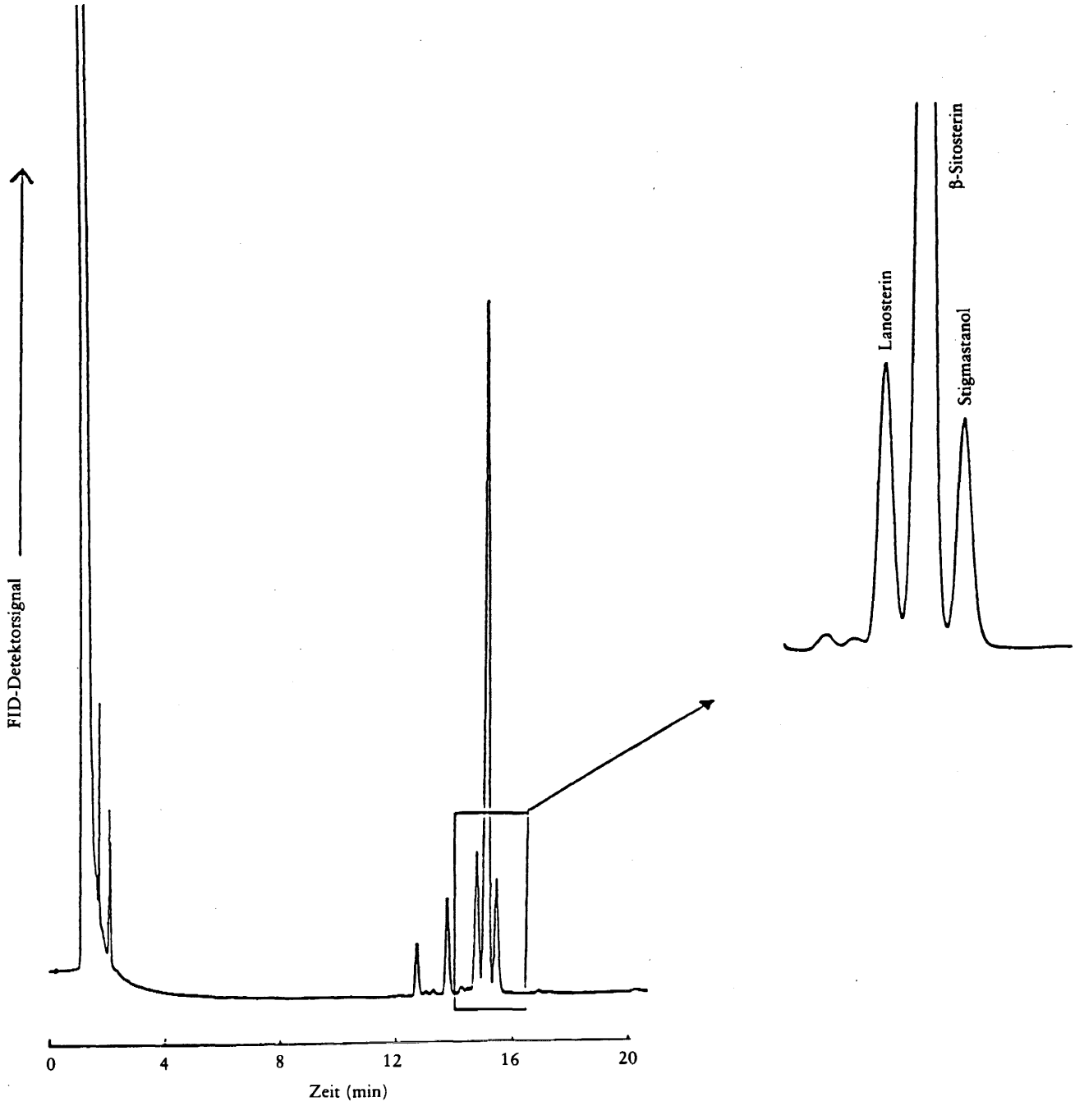


Abbildung 2a
Stigmasterin-Standard

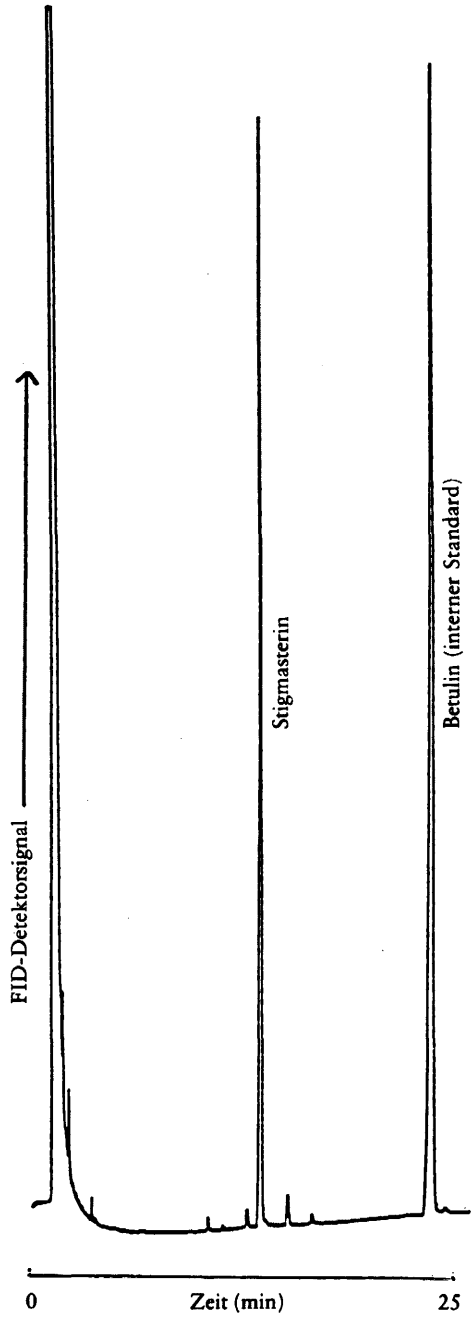
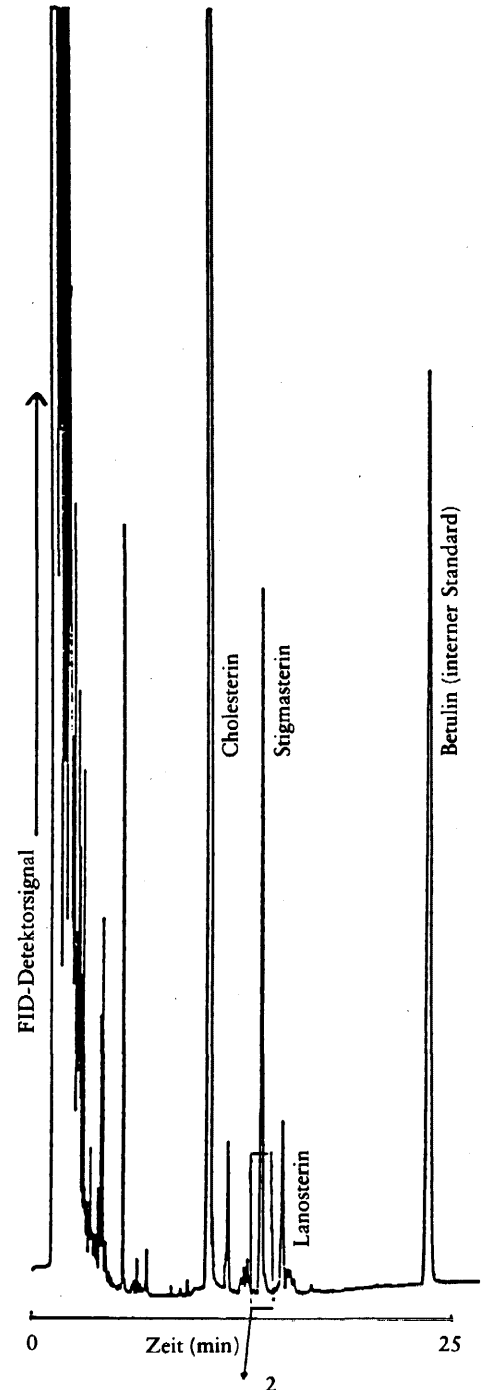


Abbildung 2b
Butterprobe,
gekennzeichnet mit Stigmasterin



Anmerkung: Bei der Integration des Stigmasterin-Peaks ist auch das von den Punkten 1, 2 und 3 markierte Tailing mit zu erfassen.

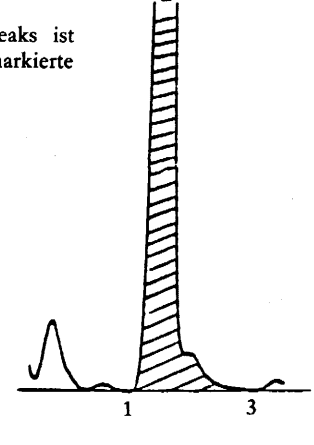


Abbildung 3a
Sitosterin-Standard

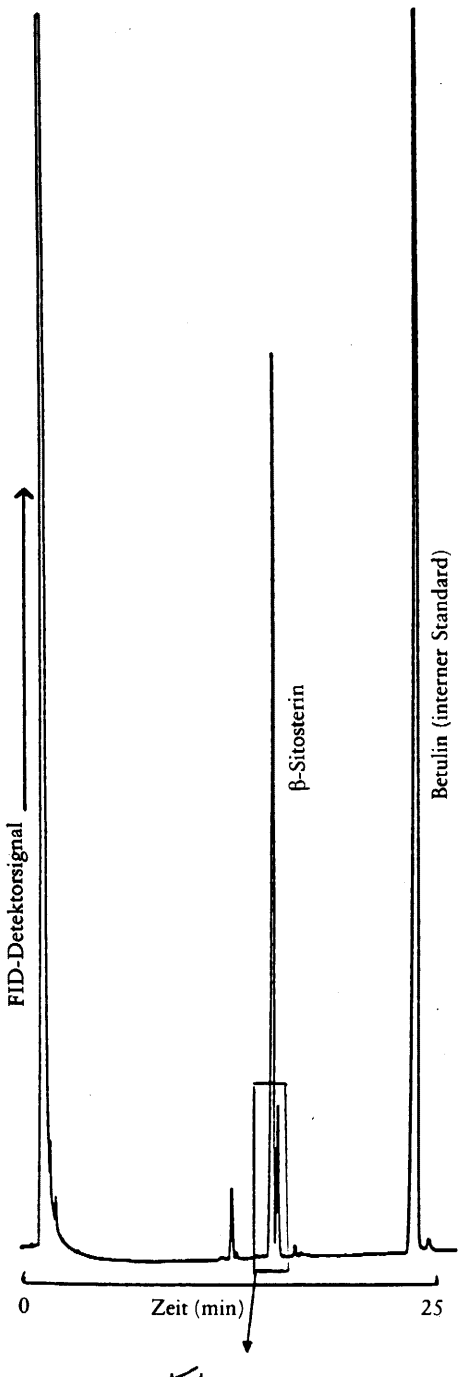
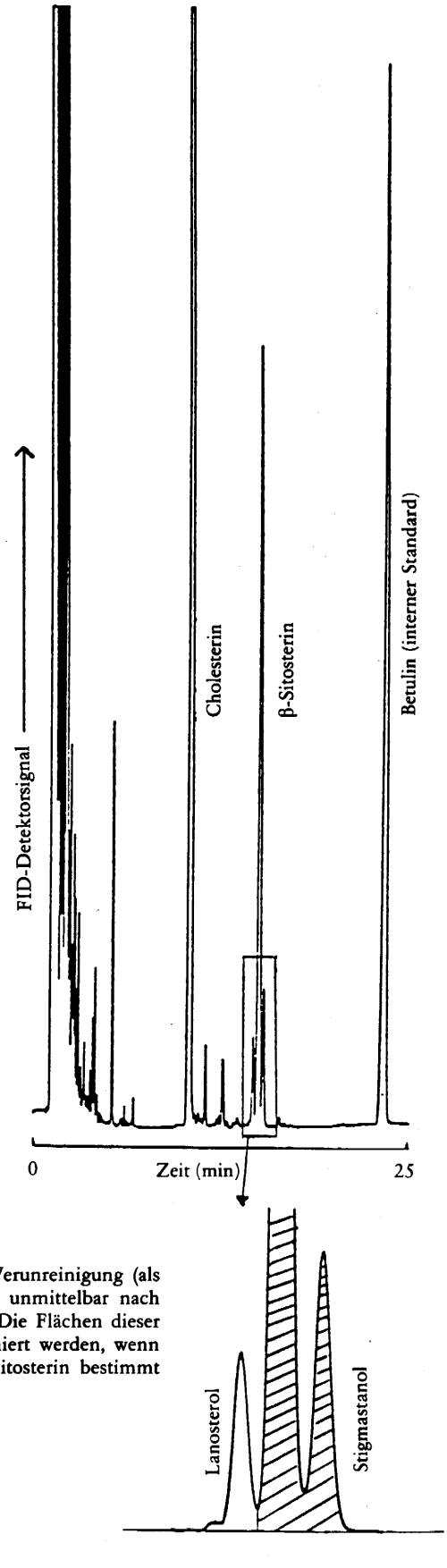


Abbildung 3b
Butterprobe,
gekennzeichnet mit β-Sitosterin



Anmerkung: β-Sitosterin enthält oft eine Verunreinigung (als Stigmastanin identifiziert), die unmittelbar nach dem β-Sitosterin eluiert wird. Die Flächen dieser beiden Peaks sollten aufsummiert werden, wenn das insgesamt vorhandene β-Sitosterin bestimmt wird.