KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 86/94

af 19. januar 1994

om fastlæggelse af en referencemetode til bestemmelse af sitosterol og stigmasterol i smør

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets forordning (EØF) nr. 804/68 af 27. juni 1968 om den fælles markedsordning for mælk og mejeriprodukter [1], senest ændret ved forordning (EØF) nr. 2071/92 [2], særlig artikel 6, stk. 7, og

ud fra følgende betragtninger:

Smør kan tilsættes røbestoffer, og dette skal kontrolleres i henhold til artikel 3 og 6 i Kommissionens forordning (EØF) nr. 570/88 [3], senest ændret ved forordning (EF) nr. 3049/93 [4];

bestemmelserne om tilsætning af røbestoffer af smør må overholdes nøje med henblik på at forhindre autoriseret anvendelse af smør, hvortil der er ydet støtte;

tilsætning af røbestoffer spiller en vigtig rolle i denne ordning, og der må derfor på EF-plan udarbejdes referencemetoder til påvisning af alle røbestoffer, der anvendes som led i denne ordning;

dermed vil der kunne sikres lige behandling af alle, der anvender denne ordning, og undgås ulige konkurrencevilkår, som forskelle i medlemsstaternes analysemetoder for øjeblikket kan resultere i;

der er fastsat en referencemetode til bestemmelse af stigmasterol og sitosterol i butteroil ved Kommissionens forordning (EØF) nr. 3942/92 [5]; denne metode kan anvendes i lidt ændret form til bestemmelse af sterolrøbestoffer i smør;

de i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Forvaltningskomitéen for Mælk og Mejeriprodukter —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

Artikel 1

Referenceanalysemetoden i bilaget anvendes, når indholdet af stigmasterol eller β-sitosterol i smør skal bestemmes i henhold til artikel 6 i forordning (EØF) nr. 570/88.

Tilsætning af røbestoffer til smør er korrekt, hvis resultaterne er i overensstemmelse med bestemmelserne i punkt 8 i bilaget til denne forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tredjedagen efter offentliggørelsen i *De Europæiske Fællesskabers Tidende.*

Den anvendes fra den 1. april 1994.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 19. januar 1994.

På Kommissionens vegne

René STEICHEN

Medlem af Kommissionen

---

(1) EFT nr. L 148 af 28. 6. 1968, s. 13.
(2) EFT nr. L 215 af 30. 7. 1992, s. 64.
(3) EFT nr. L 55 af 1. 3. 1988, s. 31.
(4) EFT nr. L 273 af 5. 11. 1993, s. 7.
(5) EFT nr. L 399 af 31. 12. 1992, s. 29.

BILAG

BESTEMMELSE AF SITOSTEROL OG STIGMASTEROL I SMØR VED GASKROMATOGRAFI I KAPILLARKOLONNE

1. ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden består i en procedure til kvantitativ bestemmelse af sitosterol og stigmasterol i smør. Ved sitosterol forstås summen af β-sitosterol og 22-dihydro-β-sitosterol, eftersom andre sisteroler anses for at være uden betydning. Dette gælder for prøver, som er udtaget i henhold til forordning (EØF) nr. 570/88.

2. PRINCIP

Smørret forsæbes med kaliumhydroxid i en ethanolopløsning og uforsæbelige bestanddele ekstraheres med diethylether.

Sterolerne omdannes til trimethylsilylethere og analyseres ved gaskromatografi i en kapillarkolonne med betulin som intern standard.

3. APPARATUR

3.1. En 150 ml kolbe til forsæbning med tilbagesvaler med glasslib.

3.2. 500 ml skilletragte.

3.3. 250 ml kolber.

3.4. Trykudligningstragte, 250 ml eller tilsvarende, til opsamling af fordampet diethylether.

3.5. Glaskolonne, 350 mm × 20 mm, med sintret glasskive.

3.6. Vandbad eller varmekappe.

3.7. Prøveglas, 2 ml.

3.8. Gaskromatograf (med splitningssystem), som egner sig til brug med kapillarkolonne, bestående af :

3.8.1. en kolonneovn, som kan opretholde den ønskede temperatur inden for ± 1 °C

3.8.2. injektionsblok med temperaturindstilling

3.8.3. flammeioniseringsdetektor og konverter/forstærker

3.8.4. skriver med integrator, som kan anvendes sammen med konverteren/forstærkeren (3.8.3).

3.9. Kapillarkolonne i kvartsglas, coated med BP1 eller tilsvarende i en ensartet lagtykkelse på 0,25 µm ; kolonnen skal kunne adskille trimethylsilylderivater af lanosterol og sitosterol — en BP1-kolonne på 12 m med 0,2 mm indre diameter er velegnet.

3.10. Mikrosprøjte på 1 µm med hærdet nål.

4. REAGENSER

Alle reagenser skal være analytisk rene. Vand skal være destilleret eller af mindst tilsvarende renhedsgrad.

4.1. Ethanol, mindst 95 %.

4.2. Kaliumhydroxid, 60 % : 600 g kaliumhydroxid (minimum 85 %) opløses i vand og fortyndes til 1 liter med vand.

4.3. Betulin, mindst 99 %.

4.3.1. Intern standardopløsning. Betulin i diethylether (4.4)

4.3.1.1. Betulinopløsningen til bestemmelse af sitosterol skal være af en koncentration på 1,0 mg/ml ;

4.3.1.2. Betulinopløsningen til bestemmelse af stigmasterol skal være af en koncentration på 0,4 mg/ml.

4.4. Analytisk ren diethylether (fri for peroxider og rester).

4.5. Natriumsulfat, vandfrit, granuleret og tørret ved 102 °C i to timer.

4.6. Silyleringsreagens, f. eks. TRI-SIL (kan fås fra Pierce Chemical Co, katalognummer 49001) eller tilsvarende. (ADVARSEL : TRI-SIL er brændbart, ætsende, giftigt og muligvis kræftfremkaldende. Laboratoriepersonalet skal have kendskab til sikkerhedsbestemmelserne for TRI-SIL og handle derefter).

4.7. Lanosterol.

4.8. Sitosterol af en kendt renhedsgrad på ikke under 90 % (P).

Note 1 : Renhedsgraden af standardmaterialer, som anvendes til kalibrering, fastsættes efter standardiseringsprincippet. Det forudsættes, at samtlige steroler, som findes i prøven, kommer til udtryk på kromatogrammet, at toppenes samlede areal repræsenterer 100 % af sterolindholdet og at sterolerne fremkalder samme detektorrespons. Systemets linearitet skal kontrolleres for de aktuelle koncentrationsområder.

4.8.1. Sitosterolstandardopløsning — der fremstilles en opløsning af sitosterol (4.8) i diethylether (4.4), indeholdende ca. 0,5 mg/ml) (med en nøjagtighed på 0,001 mg/ml) (W_1).

4.9. Stigmasterol af en kendt renhedsgrad på ikke under 90 % (P).

4.9.1. Stigmasterolstandardopløsning — der fremstilles en opløsning af stigmasterol (4.9) i diethylether (4.4), indeholdende ca. 0,2 mg/ml (med en nøjagtighed på 0,001 mg/ml (W_1).

4.10. Opløsning til kontrol af adskillelsesevne. Der fremstilles en opløsning af 0,05 mg lanosterol (4.7) og 0,5 mg sitosterol (4.8) pr. ml diethylether (4.4).

5. FREMGANGSMÅDE

5.1. Fremstilling af standardopløsning til kromatografi. Tilsætning af intern standardopløsning (4.3.1) til den pågældende sterolstandardopløsning skal ske samtidig med tilsætning til den forsæbede prøve (se 5.2.2).

5.1.1. Standardkromatografiopløsning for sitosterol ; der overføres 1 ml sitosterolstandardopløsning (4.8.1) til hvert af to prøveglas (3.7), og diethyletheren afdampes med nitrogen. Der tilsættes 1 ml intern standardopløsning (4.3.1.1), og diethyletheren afdampes med nitrogen.

5.1.2. Standardkromatografiopløsning for stigmasterol ; der overføres 1 ml stigmasterolstandardopløsning (4.9.1) til hvert af to prøveglas (3.7), og diethyletheren afdampes med nitrogen. Der tilsættes 1 ml intern standardopløsning (4.3.1.2), og diethyletheren afdampes med nitrogen.

5.2. Tilberedning af uforsæbelige bestanddele.

5.2.1. Smørprøven smeltes ved opvarmning til højst 35° C. Den blandes omhyggeligt ved omrøring. Der afvejes 1 g smør (W_2), med 1 mg nøjagtighed, i en 150 ml kolbe (3.1). Der tilsættes 50 ml ethanol (4.1) og 10 ml kaliumhydroxidopløsning (4.2). Tilbagesvaleren påsættes, og kolben opvarmes til ca. 75° C i 30 minutter. Svaleren tages af, og kolben afkøles til rumtemperatur.

5.2.2. Kolben tilsættes 1,0 ml intern standardopløsning. Hvis indholdet af sitosterol skal bestemmes, anvendes opløsningen i (4.3.1.1), hvis det drejer sig om stigmasterol, anvendes opløsningen i (4.3.1.2). Efter omhyggelig blanding overføres indholdet kvantitativt til en 500 ml skilletragt (3.2), og kolben skylles med 50 ml vand og 250 ml diethylether (4.4). Skilletragten rystes kraftigt i to minutter, hvorefter man lader faserne adskilles. Det nedre vandige lag tappes af, og etherlaget vaskes ved at ryste kolben med fire hold vand à 100 ml.

Note 2 : For at undgå emulsionsdannelse er det meget vigtigt at være forsigtig ved de første to vaskninger (kolben vendes ti gange). Ved tredje vask rystes kraftigt i 30 sekunder. En eventuel emulsion kan brydes ved at tilsætte 5 til 10 ml ethanol. Hvis der tilsættes ethanol, skal der foretages yderligere to grundige vaskninger med vand.

5.2.3. Det klare, sæbefrie etherlag ledes igennem en glaskolonne (3.5), som indeholder 30 g vandfri natriumsulfat (4.5). Etheren opsamles i en 250 ml kolbe (3.3). Der tilsættes en kogesten, og etheren afdampes til næsten tørhed i vandbad eller varmekappe, mens overskydende opløsningsmiddel omhyggeligt opsamles.

Note 3: Hvis prøveekstrakter inddampes til fuldstændig tørhed ved for høj temperatur, kan der ske tab af sterol.

5.3. Fremstilling af trimethylsilylethere.

5.3.1. Den resterende etheropløsning i kolben hældes i et 2 ml prøveglas (3.7) med 2 ml diethylether, og etheren afdampes med nitrogen. Kolben skylles med yderligere to hold diethylether à 2 ml. Indholdet hældes hver gang over i prøveglasset, og etheren afdampes med nitrogen.

5.3.2. Prøven silyleres ved tilsætning af 1 ml TRI-SIL (4.6). Prøveglasset lukkes og rystes grundigt for at opløse prøven. Hvis prøven stadig ikke er fuldstændigt opløst, opvarmes den til 65-70 °C. Prøven henstår i mindst fem minutter, inden den indsprøjtes i gaskromatografen. Referenceopløsningerne silyleres på samme måde som prøverne. Opløsningen til kontrol af adskillelsesevnen (4.10) silyleres på samme måde.

Note 4: Silylering skal foretages i vandfrit miljø. Ved ufuldstændig silylering ses en top tæt ved betulintoppen.

Ethanol, kan give interferens ved silylering. Dette kan skyldes utilstrækkelig vaskning under ekstraktionen. Hvis dette problem forekommer, kan der foretages en femte vaskning med kraftig rystning 30 sekunder under ekstraktionen.

5.4. Gaskromatografisk analyse.

5.4.1. Kromatografibetingelser.

Gaskromatografen indstilles som angivet i betjeningsvejledningen.

De vejledende kromatografibetingelser er som følger:

— kolonnetemperatur 265 °C

— injektorblokkens temperatur 280 °C

— detektorens temperatur 300 °C

— bæregassens gennemstrømningshastighed 0,6 ml/minut

— hydrogentryk 84 kPa

— lufttryk 155 kPa

— splitningssystemet indstilles til mellem 10 : 1 og 50 : 1 og optimeres i henhold til betjeningsvejledningen, hvorefter detektorresponsens linearitet kontrolleres inden for det aktuelle koncentrationsområde.

Note 5: Det er af særlig vigtighed, at injektionsblokkens belægning rengøres regelmæssigt.

— indsprøjtet mængde: 1 µl trimethylsilyletheropløsning.

Systemet skal være i ligevægt og grundlinjen stabil, inden analysen påbegyndes.

Disse betingelser kan fraviges, hvis særlige forhold ved kolonnen og gaskromatografen gør det nødvendigt for at opnå kromatogrammer, som opfylder følgende krav:

— sitosteroltoppen skal være tydeligt adskilt fra lanosteroltoppen. I figur 1 ses, hvordan et kromatogram af en silyleret opløsning til kontrol af adskillelsesevnen (4.10) typisk skal se ud

— den relative retentionstid for følgende steroler skal være ca:

Cholesterol	1,0
Stigmasterol	1,3
Sitosterol	1,5
Betulin	2,5

— retentionstiden for betulin skal være ca. 24 minutter.

5.4.2. Analyseprocedure

Der indsprøjtes 1 µl silyleret standardopløsning (stigmasterol eller sitosterol), og integratorens kalibreringsparametre indstilles.

Herefter indsprøjtes yderligere 1 µl silyleret standardopløsning for at bestemme responsfaktorerne for betulin.

Der indsprøjtes 1 µl silyleret prøveopløsning, og toppene aflæses. Hver kromatografisk serie skal indledes og afsluttes med indsprøjtning af standardopløsninger. Som hovedregel kan der indsprøjtes seks prøver i hver serie.

Note 6: Integration af stigmasteroltoppen skal også omfatte en evt. hale som afgrænset af punkt 1, 2 og 3 i figur 2b.

Integration af sitosteroltoppen skal også omfatte toppen for 22-dihydro-β-sitosterol (stigmastanol), som eluerer umiddelbart efter sitosterol se figur 3b, når den samlede mængde sitosterol bestemmes.

6. BEREGNING AF RESULTATER

6.1. Arealet af steroltoppe og betulintoppe i begge referencekromatogrammer omkring en serie bestemmes, og R_1 beregnes således:

$$R_1 = \frac{\text{gennemsnitligt topareal af sterol i standard}}{\text{gennemsnitligt topareal af betulin i standard}}$$

arealet af steroltoppen (stigmasterol eller sitosterol) og betulintoppen i prøven bestemmes, og R_2 beregnes således:

$$R_2 = \frac{\text{topareal af sterol i prøven}}{\text{topareal af betulin i prøven}}$$

W_1 = sterolindhold (i mg) i 1 ml standardopløsning (4.8.1 eller 4.9.1)

W_2 = prøvens vægt i g (5.2.1)

P = renhedsgrad af sterolstandarden (4.8 eller 4.9)

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

7. METODENS PRÆCISION

7.1. Repeterbarhed.

7.1.1. Stigmasterol.

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale foretaget umiddelbart efter hinanden af den samme person med det samme udstyr må ikke overstige 19,3 mg/kg.

7.1.2. Sitosterol.

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale foretaget umiddelbart efter hinanden af den samme person med det samme udstyr må ikke overstige 23,0 mg/kg.

7.2. Reproducerbarhed.

7.2.1. Stigmasterol.

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale, foretaget i forskellige laboratorier med forskelligt udstyr, må ikke overstige 31,9 mg/kg.

7.2.2. Sitosterol.

Forskellen mellem resultaterne af to bestemmelser af det samme prøvemateriale, foretaget i forskellige laboratorier med forskelligt udstyr, må ikke være større end 8,7 % af gennemsnittet af resultaterne.

7.3. Kilde for bestemmelserne om præcision.

Bestemmelserne om præcision er fastlagt på grundlag af et eksperiment, som i 1992 blev foretaget med otte laboratorier og seks prøver (blindbestemmelse med tre dobbeltprøver) for stigmasterol; seks prøver (blindbestemmelse med tre dobbeltprøver) for sitosterol.

8. TOLERANCER

8.1. Der udtages tre prøver fra det produkt, som er tilsat røbestof, for at sikre, at resultaterne er repræsentative.

8.2. Stigmasterol.

8.2.1. Der iblandes 150 g mindst 95 % ren stigmasterol pr. ton smør, dvs. 142,5 mg/kg; eller 170 g mindst 85 % ren stigmasterol pr. ton smør, dvs. 144,5 mg/kg.

8.2.2. Med et konventionelt konfidensinterval på 95 % (CrD_{95}) må gennemsnittet af de tre resultater ikke være lavere end

— 126,0 mg/kg ved iblanding af 95 % ren stigmasterol,

— 128,0 mg/kg ved iblanding af 85 % ren stigmasterol.

8.2.3. Udover kriterierne ovenfor anvendes det laveste resultat, som opnås ved analyse af produktet, til at kontrollere, om røbestoffet er jævnt fordelt. Dette gøres ved at sammenholde det med følgende grænseværdier:

— 116,4 mg/kg (95 % af den mindste tilladelige iblanding ved 95 % ren stigmasterol med konventionelt konfidensinterval (ISO CrD_{95}))

— 118,3 mg/kg (95 % af den mindste tilladelige iblanding ved 85 % ren stigmasterol med konventionelt konfidensinterval (ISO CrD_{95}))

— 95,1 mg/kg (80 % af den mindste tilladelige iblanding ved 95 % ren stigmasterol med konventionelt konfidensinterval (ISO CrD_{95}))

— 96,7 mg/kg (80 % af den mindste tilladelige iblanding ved 85 % ren stigmasterol med konventionelt konfidensinterval (ISO CrD_{95})).

Den laveste røbestofkoncentration i prøven sammenholdes med en interpolering mellem enten 116,4 mg/kg og 95,1 mg/kg eller 118,3 mg/kg og 96,7 mg/kg.

8.3. Sitosterol.

8.3.1. Der iblandes 600 g mindst 90 % ren sitosterol pr. ton smør, dvs. 540 mg/kg.

8.3.2. Med et konventionelt konfidensinterval på 95 % må gennemsnittet af de tre resultater ikke være lavere end 514,4 mg/kg.

8.3.3. Udover kriteriet ovenfor anvendes det laveste resultat, som opnås ved analyse af produktet, til at kontrollere, om røbestoffet er jævnt fordelt. Dette gøres ved sammenligning med følgende grænseværdier:

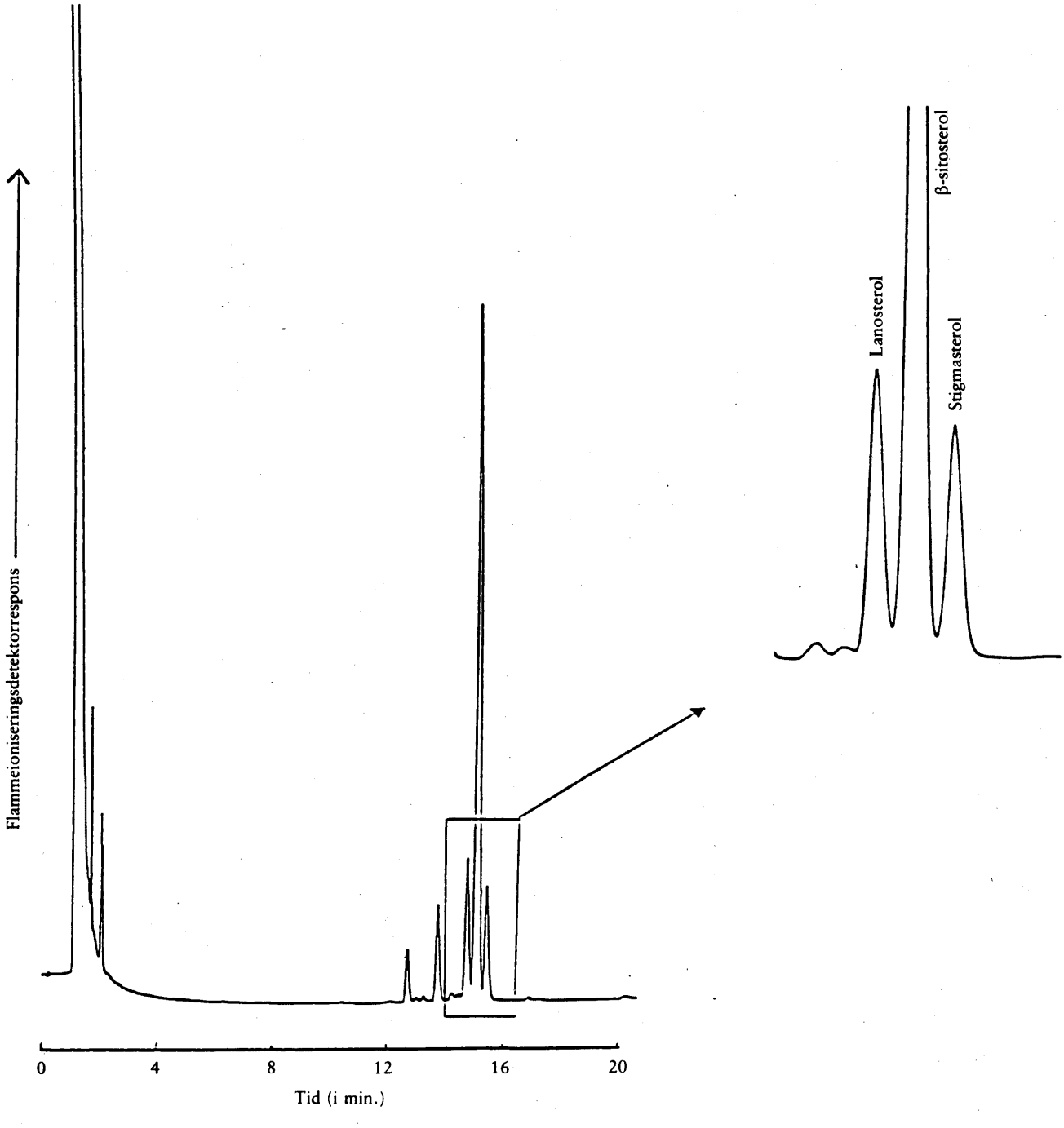
— 485,1 mg/kg (95 % af den mindste tilladelige iblanding ved 90 % ren sitosterol med konventionelt konfidensinterval (ISO CrD_{95}))

— 404,1 mg/kg (80 % af den mindste tilladelige iblanding ved 90 % ren sitosterol med konventionelt konfidensinterval (ISO CrD_{95})).

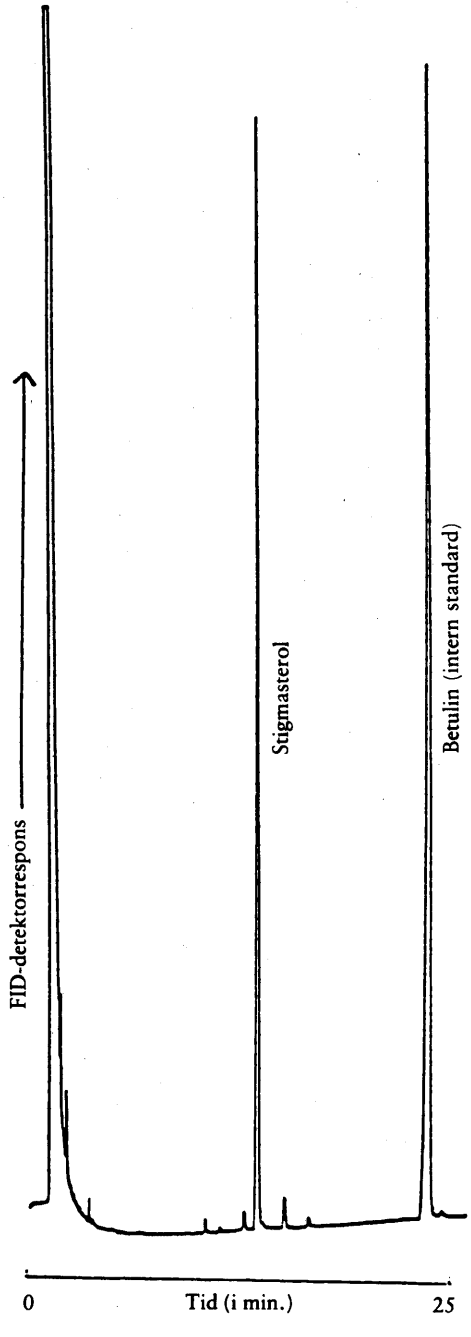
Den laveste røbestofkoncentration i prøven sammenholdes med en interpolering mellem 485,1 mg/kg og 404,1 mg/kg.

Figur 1 Kromatogram af opløsning til kontrol af adskillelsesevne

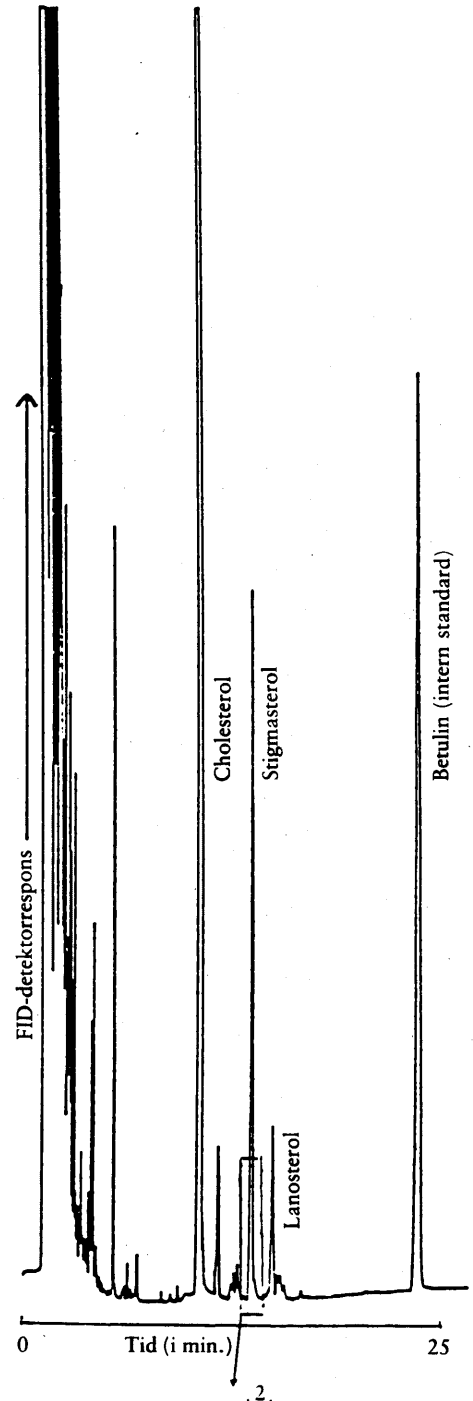
Det er bedst, hvis toppene er fuldstændig adskilt, dvs. at toppen for lanosterol går helt ned til basislinjen, før sitosteroltoppen begynder. En vis overlapning kan dog accepteres.

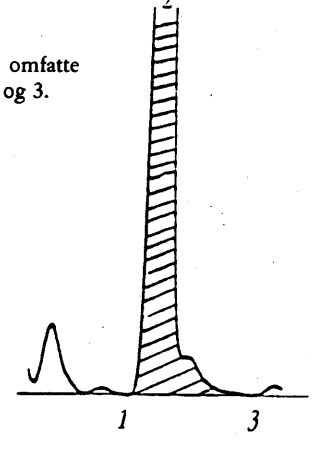


Figur 2a
Stigmasterolstandardopløsning



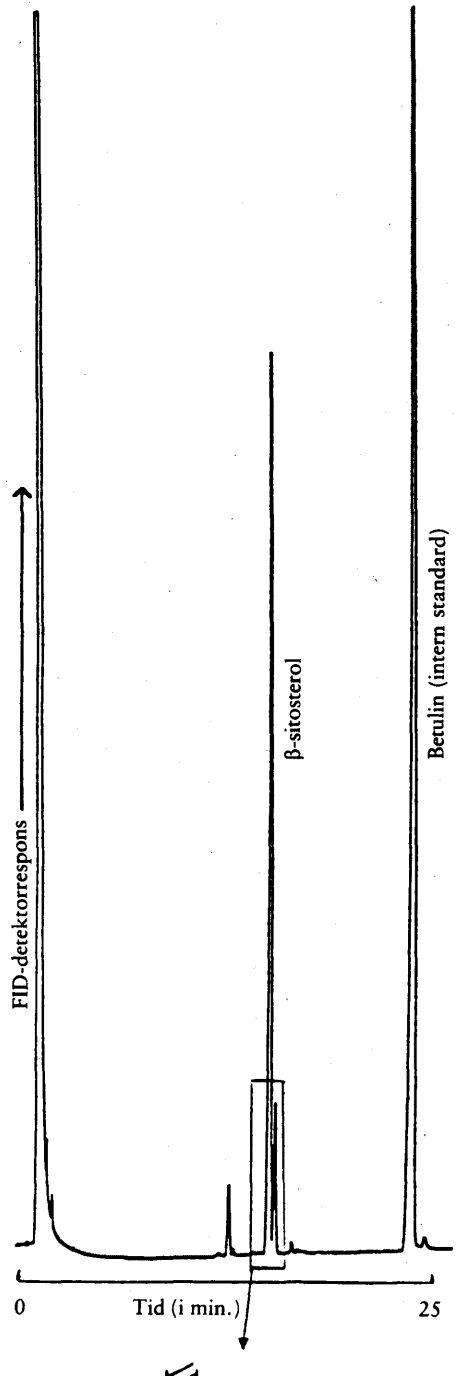
Figur 2b
Smørprøve
denatureret med stigmasterol

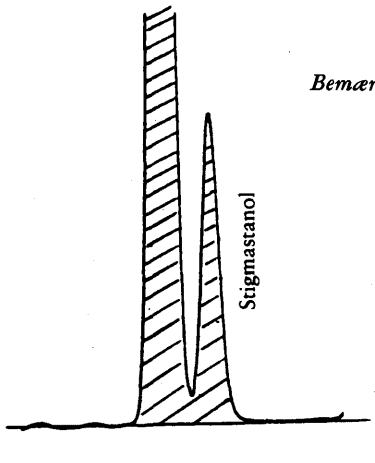




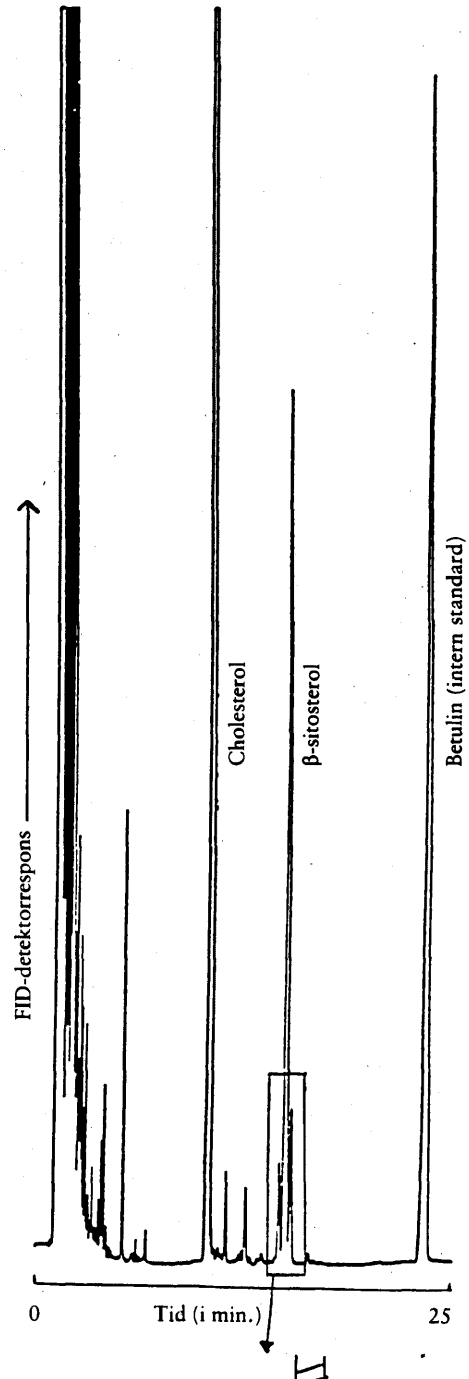
Bemærk: Integration af stigmasteroltoppen skal også omfatte en eventuel hale som afgrænset af punkt 1, 2 og 3.

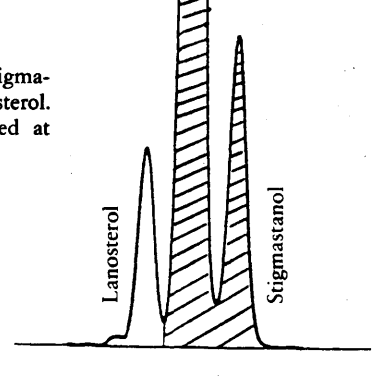
Figur 3a
β-sitosterolstandardopløsning





Figur 3b
Smørprøve
denatureret med β-sitosterol





Bemærk: β-sitosterol indeholder ofte et fremmedstof (stigmastanol), som eluerer umiddelbart efter β-sitosterol. Det samlede indhold af β-sitosterol findes ved at lægge disse to toppes arealer sammen.