ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 86/94 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 19ης Ιανουαρίου 1994

περί θεσπίσεως μεθόδου αναφοράς για τν προσδιορισμό σιτοστερόλης και στιγμαστερόλης στο βούτυρο

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 804/68 του Συμβουλίου της 27ης Ιουνίου 1968 περί της κοινής οργανώσεως αγοράς στον τομέα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων [1], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 2071/92 [2], και ιδίως το άρθρο 6 παράγραφος 7,

Εκτιμώντας:

ότι το βούτυρο ενδέχεται να ιχνηθετηθεί και τα ιχνηθετημένα προϊόντα πρέπει να ελέγχονται σύφωνα με τα άρθρα 3 και 6 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 570/88 της Επιτροπής [3], όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 3049/93 [4]·

ότι η αυστηρή τήρηση των όρων που αφορούν την ιχνηθέτηση του βουτύρου είναι αναγκαία για να αποφευχθεί ο κίνδυνος μη επιτρεπόμενης χρησιμοποίησης επιδοτούμενου βουτύρου·

ότι, λαμβανομένης υπόψη της σημασίας της ιχνηθέτησης, για τη σωστή λειτουργία του εν λόγω σχεδίου είναι αναγκαίο να θεσπιστούν κοινές μέθοδοι για τον εντοπισμό όλων των ιχνηθετών που απαιτούνται απότο εν λόγω σχέδιο που εφαρμόζονται κατά όλων των ιχνηθετών που απαιτούνται από το εν λόγω σχέδιο που εφαρμόζονται κατά τον ίδιο τρόπο σε όλη την Κοινότητα· ότι κατ' αυτό τον τρόπο θα εξασφαλισθεί, κυρίως, ίση μεταχείρηση όλων των συναλλασσόμενων φορέων που έχουν πρόσβαση στα σχέδια αυτά θα εξαλειφθούν άνισοι όροι ανταγωνισμού που ενδέχεται να προκύπτουν, προς το παρόν, λόγω διαφορετικών εθνικών μεθόδων ανάλυσης·

ότι η μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της στιγμαστερόλης και της σιτοστερόλης στο βουτυρέλαιο θεσπίστηκε με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3942/92 της Επιτροπής [5]· ότι η μέθοδος αυτή είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί με μια μικρή τροποποίηση για τον καθορισμό των ιχνηθετών στερόλης στο βούτυρο·

ότι πρέπει να καθοριστούν η ακρίβεια της μεθόδου και τα όρια ανοχής·

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της Επιτροπής Διαχείρισης Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Η μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του βουτύρου σε στιγμαστερόλη ή β-σιτοστερόλη σύμφωνα με το άρθρο 6 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 570/88, περιγράφεται στο παράρτημα.

Το βούτυρο θεωρείται ορθά ιχνηθετημένο εάν τα ληφθέντα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τις προϋποθέσεις που ορίζονται στο σημείο 8 του παραρτήματος.

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων.*

Εφαρμόζεται από την 1η Απριλίου 1994.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 19 Ιανουαρίου 1994.

Για την Επιτροπή

René STEICHEN

Μέλος της Επιτροπής

---

(1) ΕΕ αριθ. L 148 της 28. 6. 1968, σ. 13.
(2) ΕΕ αριθ. L 215 της 30. 7. 1992, σ. 64.
(3) ΕΕ αριθ. L 55 της 1. 3. 1988, σ. 31.
(4) ΕΕ αριθ. L 273 της 5. 11. 1993, σ. 7.
(5) ΕΕ αριθ. L 399 της 31. 12. 1992, σ. 29.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΤΟΣΤΕΡΟΛΗΣ Ή ΣΤΙΓΜΑΣΤΕΡΟΛΗΣ ΣΕ ΒΟΥΤΥΡΟ ΜΕ ΑΕΡΙΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗΛΗΣ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος περιγράφει μια διαδικασία ποσοτικού σιτοστερόλης ή στιγμαστερόλης σε βούτυρο. Ως σιτοστερόλη λαμβάνεται το άρθοισμα της β-σιτοστερόλης και της 22-διυδρο-β-σιτοστερόλης· άλλες σιτοστερόλες θεωρούνται αμελητέες. Εφαρμόζεται σε δείγματα ληφθέντα σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 570/88.

2. ΑΡΧΗ

Το αιθανολικό διάλυμα του βουτύρου σαπωνοποιείται με υδροξείδιο του καλίου και τα μη σαπωνοποιήσιμα εκχυλίζονται με διαιθυλαιθέρα.

Οι στερόλες μετατρέπονται σε τιμεθυλο-σιλυλο-αιθέρες και αναλύονται με αέριο χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης με βετουλίνη ως εσωτερικό πρότυπο.

3. ΣΥΣΚΕΥΕΣ

3.1. Φιάλη των 150 ml για τη σαπωνοποίηση εφοδιασμένη με εσμυρισμένο κάθετο ψυκτήρα.

3.2. Χοάνες διαχωρισμού των 500 ml.

3.3. Φιάλες των 250 ml.

3.4. Χοάνες εξισορρόπησης πίεσης των 250 ml ή παερεμφερείς, προς συλλογή του απορριπτόμενου διαιθυλαιθέρα.

3.5. Υάλινη στήλη των 350 mm × 20 mm, εφοδισμένη με υάλινο πορώδες διάφραγμα.

3.6. Υδρόλουτρο ή θερμοστατούμενο μανδύα.

3.7. Φιαλίδια αντίδρασης των 2 ml.

3.8. Αεριοχρωματογράφος, που να δέχεται τριχοειδή στήλη, εφοδιασμένος με σύστημα διαχωρισμού (splitting) αποτελούμενο από:

3.8.1. θερμοστατικό θάλαμο για στήλες ικανό προς διατήρηση της επιθυμητής θερμοκρασίας με ακρίβεια ± 1 °C·

3.8.2. είσοδο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας·

3.8.3. ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και ηλεκτρόμετρο-ενισχυτή·

3.8.4. ολοκληρωτή-καταγραφέα κατάλληλο προς χρήση με το ηλεκτρόμετρο-ενισχυτή (3.8.3).

3.9. Τριχοειδής στήλη από συντετηγμένο πυρίτιο (fused-silica) πλήρως επικαλυμμένη με BP1 ή ισοδύναμο σε ομοιόμορφο πάχος 0,25 μm· η στήλη πρέπει να είναι ικανή να διαχωρίζει τριμεθυλοσίλυλο παράγωγα λανοστερόλης και σιτοστερόλης· κατάλληλη στήλη BP1 μήκους 12 m και εσωτερικής διαμέτρου 0,2 mm.

3.10. Μικροσύριγγα του 1 μl, για αέρια χρωμογραφία, με σκληρυνθείσα βελόνα.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναγνωρισμένης αναλυτικής καθαρότητας. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο ή ισοδύναμης, τουλάχιστον, καθαρότητας.

4.1. Αιθανόλη, τουλάχιστον 95 %.

4.2. Υδροξείδιο του καλίου, διάλυμα 60 %: διαλύονται 600 g υδροξειδίου του καλίου (τουλάχιστον 85 %) σε νερό και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρις ενός λίτρου με νερό.

4.3. Βετουλίνη καθαρότητας τουλάχιστον 99 %.

4.3.1. Διαλύματα εσωτερικού προτύπου. Βετουλίνη σε διαιθυλαιθέρα (4.4).

4.3.1.1. Η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου διαλύματος βετουλίνης προς προσδιορισμό της σιτοστερόλης πρέπει να είναι 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. Η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου διαλύματος βετουλίνης προς προσδιορισμό της στιγμαστερόλης πρέπει να είναι 0,4 mg/ml.

4.4. Διαιθυλαιθέρας, αναλυτικής καθαρότητας (απηλλαγμένος υπεροξειδίων ή υπολειμμάτων).

4.5. Θειικό νάτριο, άνυδρο, κοκκώδες, προξηρανθέν στους 102 °C επί δύο ώρες.

4.6. Αντιδραστήριο σιλυλίωσης, για παράδειγμα TRI-SIL (διαθέσιμο από την Pierce Chemical Co., Cat No. 49001) ή ισοδύναμο (ΠΡΟΣΟΧΗ: το TRI-SIL είναι εύφλεκτο, τοξικό, διαβρωτικό και πιθανώς καρκινογόνο. Το εργοστηριακό προσωπικό πρέπει να είναι εξοικειωμένο με τα στοιχεία ασφαλείας του TRI-SIL και να λαμβάνει τις απαραίτητες προφυλάξεις).

4.7. Λανοστερόλη.

4.8. Σιτοστερόλη γνωστής καθαρότητας τουλάχιστον 90 % (P).

Σημείωση 1: Η καθαρότητα των χρησιμοποιούμενων προς βαθμονόμηση πρότυπων ουσιών πρέπει να πρσδιοριστεί με τη μέθοδο της κανονικοποίησης. Υποτίθεται ότι όλες οι στερόλες που υπάρχουν στο δείγμα εμφανίζονται στο χρωματογράφημα, ότι η συνολική επιφάνεια των κορυφών αντιπροσωπεύει το 100 % των συστατικών στερολών και ότι οι στερόλες έχουν την ίδια απόκριση στον ανιχνευτή. Η γραμμικότητα του συστήματος πρέπει να επαληθεύεται στις συγκεντρεις που ενδιαφέρουν.

4.8.1. Πρότυπο διάλυμα σιτοστερόλης — παρασκευάζεται διάλυμα περιέχον, με ακρίβεια 0,001 mg/ml, περίπου 0,5 mg/ml (W_1) σιτοστερόλης (4.8) σε διαιθυλαιθέρα (4.4).

4.9. Στιγμαστερόλη γνωστής καθαρότητας, τουλάχιστον 90 % (P).

4.9.1. Πρότυπο διάλυμα στιγμαστερόλης παρασκευάζεται διάλυμα περιέχον, με ακρίβεια 0,001 mg/ml, περίπου 0,2 mg/ml (W_1) στιγμαστερόλης (4.9) σε διαιθυλαιθέρα (4.4).

4.10. Μείγμα ελέγχου διαχωριστικής ικανότητας. Παρασκευάζεται διάλυμα περιέχον 0,05 mg/ml λανοστερόλης (4.7) και 0,5 mg/ml σιτοστερόλης (4.8) σε διαιθυλαιθέρα (4.4).

5. ΠΟΡΕΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

5.1. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων χρωματογραφίας. Το διάλυμα εσωτερικού πρότυπου (4.3.1) πρέπει να προστεθεί στο ανάλογο πρότυπο διάλυμα στερόλης ταυτόχρονα με την προσθήκη του και στο σαπωνοποιηθέν δείγμα (5.2.2).

5.1.1. Πρότυπο χρωματογραφικό διάλυμα σιτοστερόλης· μεταφέρεται 1 ml πρότυπου διαλύματος σιτοστερόλης (4.8.1) σε καθένα από δύο φιαλίδια αντίδρασης (3.7) και ο διαιθυλαιθέρας απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου. Προστίθεται 1 ml διαλύματος εσωτερικού πρότυπου (4.3.1.1) και ο διαιθυλαιθέρας απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου.

5.1.2. Πρότυπο χρωματογραφικό διάλυμα στιγμαστερόλης: μεταφέρεται 1 ml πρότυπου διαλύματος στιγμαστερόλης (4.9.1) σε καθένα από δύο φιαλίδια αντίδρασης (3.7) και ο διαιθυλαιθέρας απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου. Προστίθεται 1 ml διαλύματος εσωτερικού πρότυπου (4.3.1.2) και ο διαιθυλαιθέρας απομακρύνεται με ρεύμα αζώτου.

5.2. Παρασκευή των μη σαπωνοποιήσιμων.

5.2.1. Τήκεται το δείγμα του βουτύρου σε θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη από 35 °C, αναμειγνύεται καλά με ανάδευση, ζυγίζεται με προσέγγιση 1 mg, 1 g περίπου βουτύρου (W_2) σε φιάλη των 150 ml (3.1). Προστίθενται 50 ml αιθανόλης (4.1) και 10 ml διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (4.2). Προσαρμόζεται ο κάθετος ψυκτήρας και το όλο θερμαίνεται στους 75 °C επί 30 λεπτά. Ο ψυκτήρας αποσυνδέεται και η φιάλη ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

5.2.2. Προστίθεται στη φιάλη 1,0 ml διαλύματος εσωτερικού πρότυπου (4.3.1.1) εάν πρόκειται να προσδιοριστεί σιτοστερόλη, ή (4.3.1.2), εάν πρόκειται να προσδιοριστεί στιγμαστερόλη. Γίνεται πλήρης ανάμειξη. Το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρεται ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη των 500 ml (3.2), και εκπλύεται στη συνέχεια η φιάλη με 50 ml νερού και 250 ml διαιθυλαιθέρα (4.4). Η διαχωριστική χοάνη ανακινείται ζωηρά επί δύο λεπτά και αφήνονται οι φάσεις να διαχωριστούν. Η κατώτερη υδατική στοιβάδα αποχύνεται και η στοιβάδα του αιθέρα εκπλύεται με ανάδευση με τέσσερις διαδοχικές δόσεις νερού των 100 ml.

Σημείωση 2: Είναι ουσιώδες, προς αποφυγή σχηματισμού γαλακτώματος, να εκτελεστούν ήπια οι δύο πρώτες εκπλήσεις με νερό (10 αναστροφές). Η τρίτη έκπλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ζωηρή ανάδευση επί 30 δευτερόλεπτα. Εάν σχηματιστεί γαλάκτωμα μπορεί να δισπασθεί με την προσθήκη 5 έως 10 ml αιθανόλης. Εάν προστεθεί αιθανόλη, πρέπει να εκτελεστούν δύο ακόμα ζωηρές εκπλύσεις με νερό.

5.2.3. Η καθαρή, απαλλαγμένη σάπωνος στοιβάδα αιθέρα διαβιβάζεται μέσα από υάλινη στήλη (3.5) περιέχουσα 30 g άνυδρου θειικού νατρίου (4.5). Ο αιθέρας συλλέγεται σε φιάλη των 250 ml (3.3). Προστίθεται 1 σφαιρίδιο βρασμού και ακολουθεί εξάτμιση σχεδόν μέχρι ξηρού σε υδρόλουτρο ή θερμοστατούμενο μανδύα, λαμβάνοντας μέριμνα για τη συλλογή των απορριπτόμενων διαλυτών.

Σημείωση 3: Εάν τα εκχυλίσματα του δείγματος ξηραθούν πλήρως σε πολύ υψηλή θερμοκρασία, πιθανόν να επέλθουν απώλειες στερόλης.

5.3. Παρασκευή τριμεθυλο-σιλυλο-αιθέρων.

5.3.1. Το αιθερικό διάλυμα που παρέμεινε στη φιάλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο αντίδρασης των 2 ml (3.7) με 2 ml διαιθυλαιθέρα και ο αιθέρας απομακρύνεται χρησιμοποιώντας ρεύμα αζώτου. Η φιάλη εκπλύεται σε δύο ακόμη δόσεις διαιθυλαιθέρα των 2 ml, που μεταφέρονται στο φιαλίδιο και απομακρύνεται ο αιθέρας με άζωτο κάθε φορά.

5.3.2. Το δείγμα σιλυλιούται με προσθήκη 1 ml TRI-SIL (4.6). Το φιαλίδιο κλείνεται και αναδεύεται ζωηρά ώστε να επέλθει διάλυση. Εάν η διάλυση δεν είναι πλήρης, θερμαίνεται στους 65 έως 70 °C. Αφήνεται να ηρεμήσει επί τουλάχιστον 5 λεπτά πριν ενωθεί στον αεριοχρωματογράφο. Τα πρότυπα σιλυλιούνται κατά τον ίδιο τρόπο με τα δείγματα. Το μείγμα ελέγχου της διαχωριστικής ικανότητας (4.10) σιλυλιούται κατά τον ίδιο τρόπο με τα δείγματα.

Σημείωση 4: Η σιλυλίωση πρέπει να λάβει χώρα σε περιβάλλον απηλλαγμένο από νερό. Η μη πλήρης σιλυλίωση της βετουλίνης εντοπίζεται από μια δεύτερη κορυφή κοντά σε αυτή της βετουλίνης.

Η παρουσία αιθανόλης στο στάδιο της σιλυλίωσης θα έχει επίδραση στη σιλυλίωση. Αυτό μπορεί να προκύψει από ανεπαρκή έκπλυση κατά το στάδιο εκχύλισης. Εάν το πρόβλημα αυτό επιμένει, μια πέμπτη έκπλυση, με ζωηρή ανάδευση επί 30 δευτερόλεπτα, μπορεί να εισαχθεί στο στάδιο εκχύλισης.

5.4. Αεριοχρωματογραφική ανάλυση.

5.4.1. Επιλογή συνθηκών λειτουργίας.

Ο αεριοχρωματογράφος ρυθμίζεται ανάλογα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι συνιστώμενες συνθήκες λειτουργίας είναι οι εξής:

— θερμοκρασία στήλης: 265 °C

— θερμοκρασία εισόδου: 280 °C

— θερμοκρασία ανιχνευτή: 300 °C

— ταχύτητα ροής φέροντος αερίου: 0,6 ml/λεπτό

— πίεση υδρογόνου: 84 kPa

— πίεση αέρα: 155 kPa

— διαχωρισμός δείγματος 10:1 έως 50:1, ο λόγος διαχωρισμού πρέπει να βελτιστοποιηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευασή και κατόπιν να εξεταστεί η γραμμικότητα της απόκρισης του ανιχνευτή στην περιοχή συγκεντρώσεων που ενδιαφέρει.

Σημείωση 5: Είναι εξαιρετικά σημαντικό να καθαρίζεται τακτικά ο υποδοχέας έγχυσης.

— ποσότητα ενιόμενης ουσίας: 1 μl διαλύματος TMSE.

Το σύστημα αφήνεται να εξισορροπήσει και να αποκτήσει μια ικανοποιητικά σταθερή απόκριση, πριν αρχίσει οποιαδήποτε ανάλυση.

Οι συνθήκες αυτές μπορούν να μεταβάλλονται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της στήλης και του αεριοχρωματογράφου, έτσι ώστε να λαμβάνονται χρωματογραφήματα που να εκπληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

— η κορυφή της σιτοστερόλης πρέπει να διαχωρίζεται επαρκώς από αυτή της λανοστερόλης. Το σχήμα 1 δείχνει το τυπικό χρωματογράφημα που πρέπει να ληφθεί από το σιλυλιωμένο μείγμα ελέγχου της διαχωριστικής ικανότητας (4.10),

— οι σχετικοί χρόνοι κατακράτησης για τις ακόλουθες στερόλες πρέπει να είναι κατά προσέγγιση:

Χοληστερόλη: 1,0

Στιγμαστερόλη: 1,3

Σιτοστερόλη: 1,5

Βετουλίνη: 2,5,

— ο χρόνος κατακράτησης της βετουλίνης πρέπει να είναι κατά προσέγγιση 24 λεπτά.

5.4.2. Αναλυτική πορεία εργασίας

Ενίεται 1μl σιλυλιωμένου πρότυπου διαλύματος (στιγμαστερόλης ή σιτοστερόλης) και ρυθμίζονται οι παράμετροι βαθμονόμησης του ολοκληρωτή.

Ενίεται 1μl σιλυλιωμένου πρότυπου διαλύματος προς προσδιορισμό των σχετικών συντελεστών απόκρισης ως προς βετουλίνη.

Ενίεται 1 μl σιλυλιωμένου διαλύματος και μετρώνται τα εμβαδά των κορυφών. Κάθε σειρά χρωματογραφικών αναλύσεων πρέπει να παρεμβάλλεται μεταξύ αναλύσεων προτύπων. Κατά κανόνα έξι εκγχύσεις δειγμάτων παρεμβάλλονται μεταξύ δύο ενέσεων προτύπων.

Σημείωση 6: Η ολοκλήρωση της κορυφής της στιγμαστερόλης πρέπει να συμπεριλαμβάνει κάθε τυχόν τμήμα «ουράς» όπως ορίζεται από τα σημεία 1, 2 και 3 στο σχήμα 2β.

Η ολοκλήρωση της κορυφής της σιτοστερόλης πρέπει να συμπεριλαμβάνει το εμβαδόν της κορυφής της 22-διυδρο-β-σιτοστερόλης (στιγμαστανόλης), η οποία εκλούεται αμέσως μετά τη σιτοστερόλη (βλέπε σχήμα 3β), όταν μετράται η συνολική σιτοστερόλη.

6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

6.1. Προσδιορίζεται το εμβαδόν των κορυφών των στερολών και των κορυφών βετουλίνης που συνοδεύουν μια σειρά αναλύσεων, και υπολογίζεται το R_1:

$$R_1 = \frac{\text{Μέσο εμβαδόν κορυφών στερολών στο πρότυπο}}{\text{Μέσο εμβαδόν κορυφών βετουλίνης στο πρότυπο}}$$

Προσδιορίζεται το εμβαδόν των κορυφών της στερόλης (στιγμαστερόλης ή σιτοστερόλης) και της κορυφής ης βετουλίνης στο δείγμα και υπολογίζεται το R_2:

$$R_2 = \frac{\text{Εμβαδόν κορυφής στερόλης στο δείγμα}}{\text{Εμβαδόν κορυφής βετουλίνης στο δείγμα}}$$

W_1 = περιεκτικότητα πρότυπου σε στερόλη (mg) περιεχομένη σε 1 ml πρότυπου διαλύματος (4.8.1 ή 4.9.1)

W_2 = βάρος δείγματος (g) (5.2.1)

P = καθαρότητα πρότυπης στερόλης (4.8 ή 4.9)

$$\text{Περιεκτικότητα του δείγματος σε στερόλη (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10.$$

7. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

7.1. Επαναληψιμότητα

7.1.1. Στιγμαστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, από ένα χειριστή που χρησιμοποιεί το ίδιο όργανο με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 19,3 mg/kg.

7.1.2. Σιτοστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων εντός του συντομότερου δυνατού χρονικού διαστήματος, από ένα χειριστή που χρησιμοποιεί το ίδιο όργανο με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 23,0 mg/kg.

7.2. Αναπαραγωγικότητα

7.2.1. Στιγμαστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων από χειριστές σε διαφορετικά εργαστήρια, χρησιμοποιώντας διαφορετικά όργανα με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 31,9 mg/kg.

7.2.2. Σιτοστερόλη

Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών εκτελεσθέντων από χειριστές σε διαφορετικά εργαστήρια, χρησιμοποιώντας διαφορετικά όργανα με πανομοιότυπο αναλυτικό υλικό δεν πρέπει να υπερβαίνει το 8,7 % του μέσου των προσδιορισμών.

7.3. Πηγή δεδομένων ακριβείας

Τα δεδομένα ακριβείας προσδιορίστηκαν σε πείραμα εκτελεσθέν το 1992, που περιλάμβανε οκτώ εργαστήρια, έξι δείγματα (τρία τυφλά) στιγμαστερόλης και έξι δείγματα (τρία τυφλά) σιτοστερόλης.

8. ΟΡΙΑ ΑΝΟΧΗΣ

8.1. Πρέπει να λαμβάνονται τρία δείγματα από το ιχνηθετημένο προϊόν προς έλεγχο της ομοιογένειας.

8.2. Στιγμαστερόλη

8.2.1. Το ποσοστό ενσωμάτωσης της στιγμαστερόλης είναι 150 γραμμάρια στιγμαστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 95 % ανά τόνο βουτύρου, δηλαδή 142,5 mg/kg ή 170 γραμμάρια στιγμαστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 85 % ανά τόνο βουτύρου, δηλαδή 144,5 mg/kg.

8.2.2. Λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε τιμή πιθανότητας 95 % CrD_{95}, ο μέσος όρος των τριών αποτελεσμάτων δεν είναι μικρότερος από 126,0 mg/kg για στιγμαστερόλη καθαρότητας 95 % ή μικρότερος από 128,0 mg/kg για στιγμαστερόλη καθαρότητας 85 %.

8.2.3. Επιπλέον των κριτηρίων του σημείου 8.2.2, το μικρότερο αποτέλεσμα που προκύπτει από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιείται για έλεγχο της ομοιογένειας της κατανομής του ιχνηθέτη. Αυτό γίνεται δια συγκρίσεως με τις παρακάτω οριακές τιμές:

— 116,4 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 95 %, CrD_{95}, λαμβανομένης υπόψη για ένα μόνο δείγμα),

— 118,3 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 85 %, της CrD_{95}, λαμβανομένης υπόψη για ένα μόνο δείγμα),

— 95,1 mg/kg (80 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 95 %, της CrD_{95}, λαμβανομένης υπόψη για ένα μόνο δείγμα),

— 96,7 mg/kg (80 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 85 %, της CrD_{95}, λαμβανομένης υπόψη για ένα μόνο δείγμα),

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτουν οι χαμηλότερες τιμές χρησιμοποιείται μαζί με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 116,4 mg/kg και 95,1 mg/kg, ή μεταξύ των τιμών 118,3 mg/kg και 96,7 mg/kg, αντιστοίχως.

8.3. Σιτοστερόλη

8.3.1. Το ποσοστό ενσωμάτωσης για τη σιτοστερόλη είναι 600 γραμμάρια σιτοστερόλης καθαρότητας τουλάχιστον 90 % ανά τόνο βουτύρου, ήτοι 540 mg/kg.

8.3.2. Λαμβανομένης υπόψη της CrD_{95}, ο μέσος όρος των τριών αποτελεσμάτων δεν είναι μικρότερος από 514,4 mg/kg.

8.3.3. Επιπλέον του κριτηρίου του σημείου 8.3.2, το χαμηλότερο αποτέλεσμα που προκύπτει από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιείται για έλεγχο της ομοιογένειας της κατανομής του ιχνηθέτη. Αυτό γίνεται δια συγκρίσεως με τις παρακάτω οριακές τιμές:

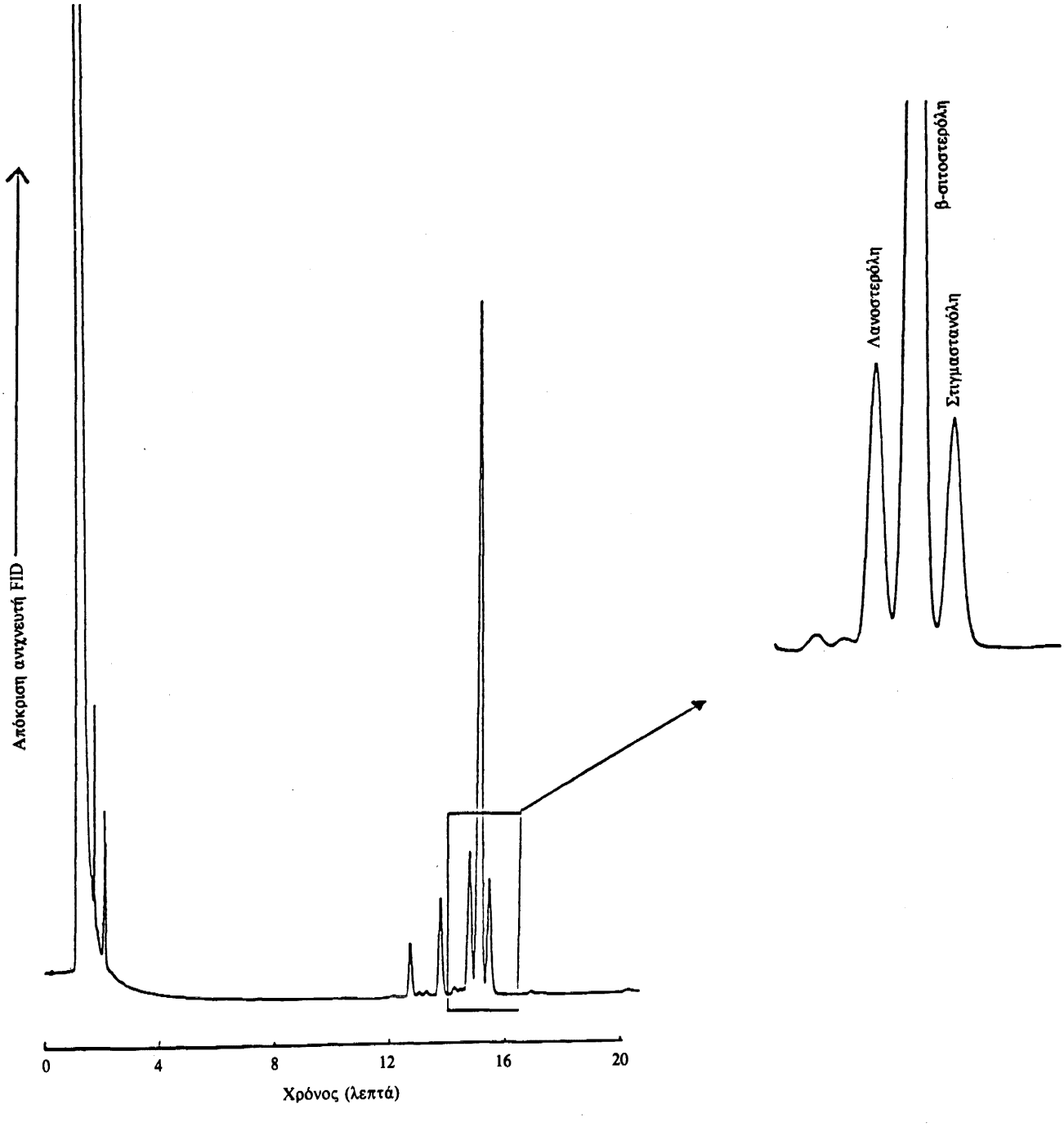
— 485,1 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 90 %, λαμβανομένης υπόψη της CrD_{95}, για ένα μόνο δείγμα),

— 404,1 mg/kg (80 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 90 %, λαμβανομένης υπόψη CrD_{95} για ένα μόνο δείγμα),

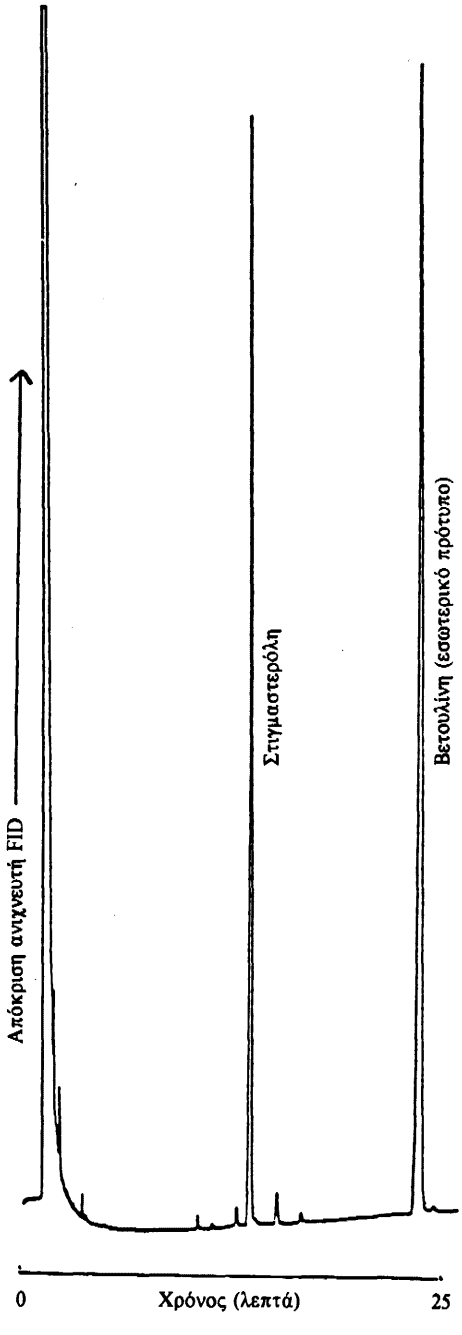
Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα το οποίο δείγμα το οποίο δίδει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται όταν περιβάλλεται μεταξύ των 485,1 mg/kg και 404,1 mg/kg.

Σχήμα 1 Χρωματογράφημα μείγματος ελέγχου διαχωριστικής ικανότητας

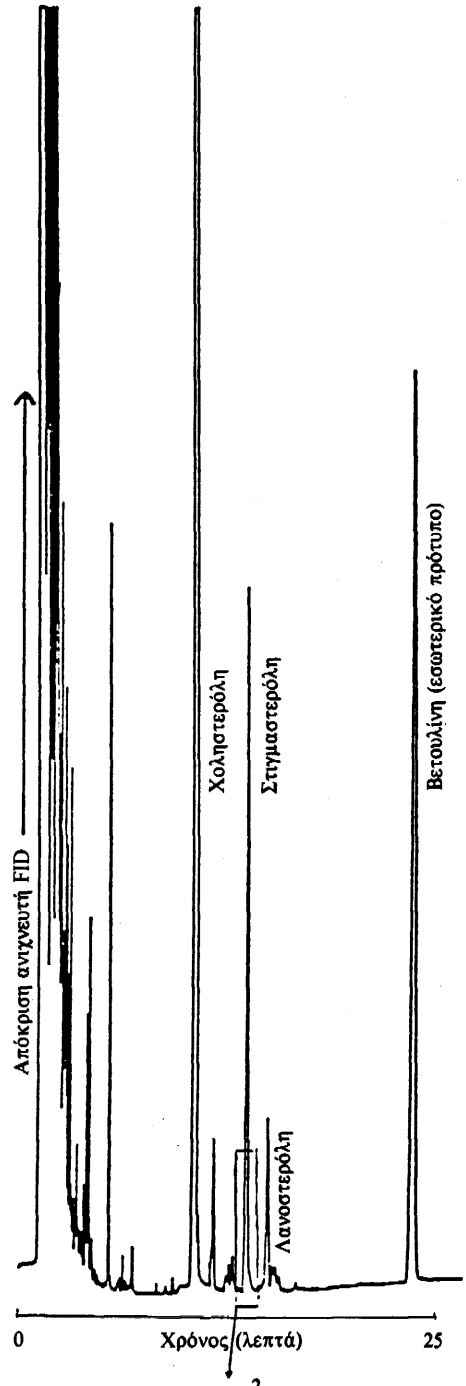
Προτιμάται ο πλήρης διαχωρισμός, δηλαδή το περίγραμμα της κορυφής της λανοστερόλης πρέπει να επιστρέφει στη γραμμή βάσης πριν αρχίσει η κορυφή της σιτοστερόλης, αν και είναι ανεκτός μη πλήρης διαχωρισμός.



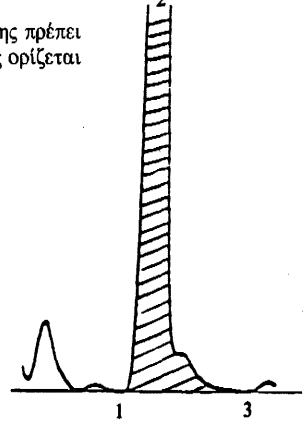
Σχήμα 2α
Πρότυπο στιγμαστερόλης



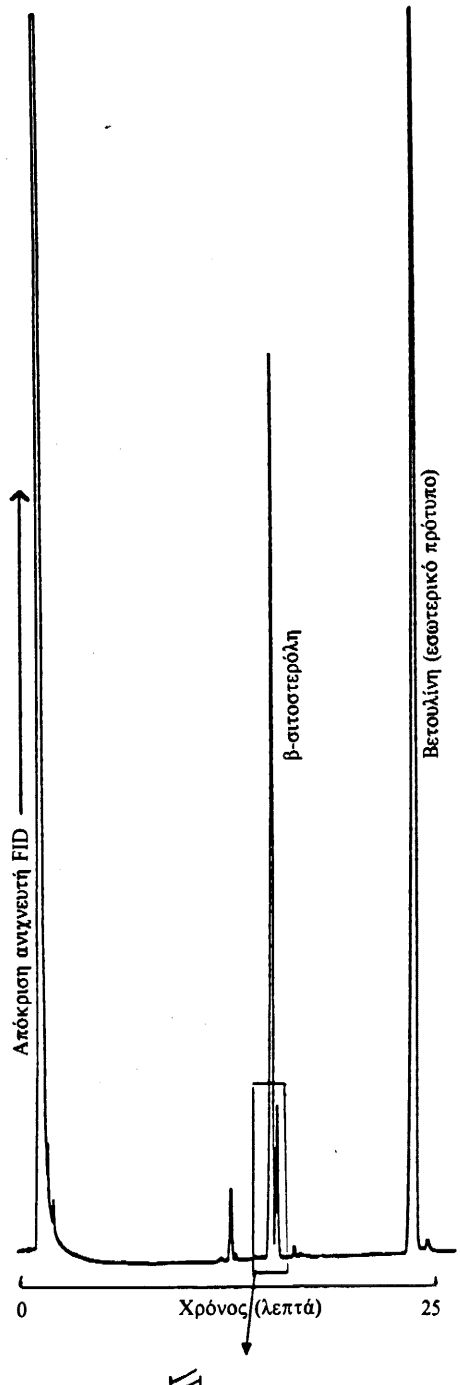
Σχήμα 2β
Δείγμα βουτύρου
μετουσιωμένο με στιγμαστερόλη



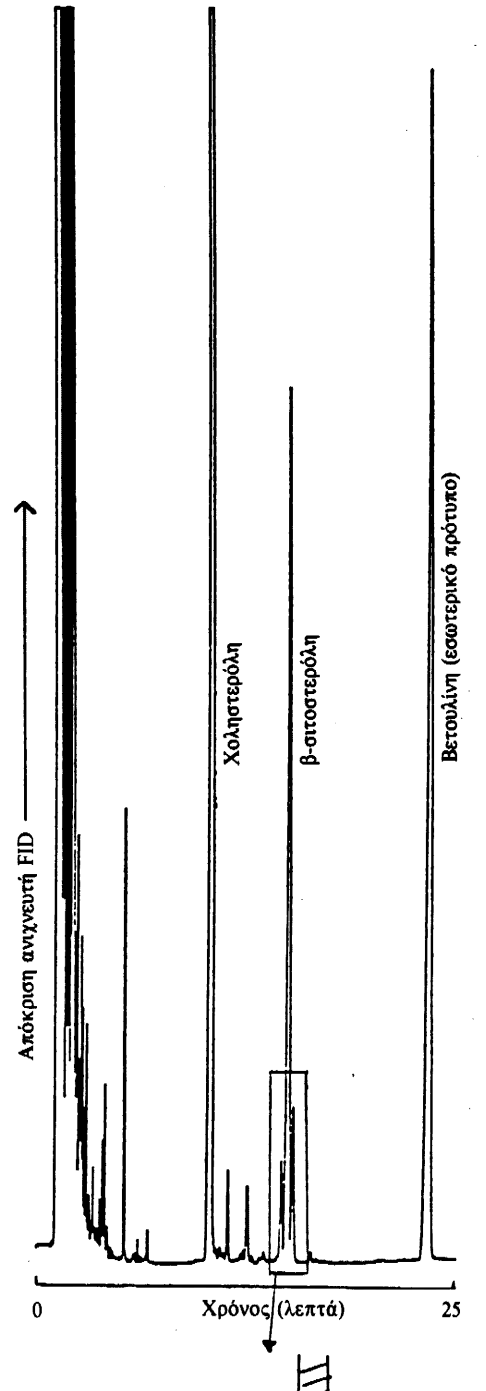
Σημείωση: Η ολοκλήρωση της κορυφής της στιγμαστερόλης πρέπει να συμπεριλαμβάνει κάθε τμήμα «ουράς» όπως ορίζεται από τα σημεία 1, 2, και 3.



Σχήμα 3α
Πρότυπο β-σιτοστερόλη



Σχήμα 3β
Δείγμα βουτύρου
μετουσιωμένο με β-σιτοστερόλη



Σημείωση: Η β-σιτοστερόλη συχνά περιέχει μία πρόσμειξη (ταυτοποιηθείσα ως στιγμαστανόλη) που εκλούεται αμέσως μετά τη β-σιτοστερόλη. Τα εμβαδά των δύο αυτών κορυφών πρέπει να προστίθενται κατά τον υπολογισμό της ολικής β-σιτοστερόλης.