

Dette dokument er et dokumentationsredskab, og institutionerne påtager sig intet ansvar herfor

► **B**

**KOMMISSIONENS FORORDNING (EØF) nr. 3942/92**

**af 22. december 1992**

**om fastlæggelse af en referencemetode til bestemmelse af sitosterol og stigmasterol i butteroil**

(EFT L 399 af 31.12.1992, s. 29)

Ændret ved:

		nr.	Tidende side	dato
► <b><u>M1</u></b>	Kommissionens forordning (EØF) nr. 2539/93 af 15. september 1993	L 233	1	16.9.1993
► <b><u>M2</u></b>	Kommissionens forordning (EF) nr. 175/1999 af 26. januar 1999	L 20	22	27.1.1999

▼B

**KOMMISSIONENS FORORDNING (EØF) nr. 3942/92**  
**af 22. december 1992**  
**om fastlæggelse af en referencemetode til bestemmelse af sitosterol**  
**og stigmasterol i butteroil**

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Traktaten om Oprettelse af Det Europæiske Økonomiske Fællesskab,

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

ud fra følgende betragtninger:

Butteroil skal kunne spores og kontrolleres i henhold til Kommissionens forordning (EØF) nr. 3143/85 <sup>(3)</sup>, senest ændret ved forordning (EØF) nr. 1264/92 <sup>(4)</sup>, særlig artikel 5 og 6;

butteroil kan spores og skal kontrolleres i henhold til Kommissionens forordning (EØF) nr. 570/88 <sup>(5)</sup>, senest ændret ved forordning (EØF) nr. 124/92 <sup>(6)</sup>, særlig artikel 3 og 6;

butteroil skal kunne spores og kontrolleres i henhold til Kommissionens forordning (EØF) nr. 429/90 <sup>(7)</sup>, senest ændret ved forordning (EØF) nr. 1264/92, særlig artikel 10 og 11;

bestemmelserne om sporing af butteroil må overholdes nøje med henblik på at forhindre uautoriseret anvendelse af smør, hvortil der er ydet støtte;

sporing spiller en vigtig rolle i disse støtteordninger, og der må derfor på EF-plan udarbejdes referencemetoder til påvisning af sporestoffer, der anvendes som led i disse ordninger;

dermed vil det kunne sikres, at man ikke i forbindelse med disse ordninger forskelsbehandler visse parter eller forvrider konkurrencevilkårene, som det kan være tilfældet nu som følge af forskelle i medlemsstaternes analysemetoder;

det er vanskeligt at udarbejde sådanne referencemetoder for samtlige sporestoffer samtidigt; det vil være et skridt på vejen, hvis der fastsættes en referencemetode til bestemmelse af stigmasterol og sitosterol i butteroil;

foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra Forvaltningskomitéen for Mælk og Mejeriprodukter —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

*Artikel 1*

▼M1

Referenceanalysemetoden til bestemmelse af indholdet af stigmasterol i butteroil i henhold til artikel 6 i forordning (EØF) nr. 3143/85, artikel 6 i ►M2 forordning (EF) nr. 2571/97 ◀ eller artikel 11 i forordning (EØF) nr. 429/90 og indholdet af β-sitosterol i butteroil i henhold til artikel 6 i ►M2 forordning (EF) nr. 2571/97 ◀ er fastsat i bilaget.

<sup>(1)</sup> EFT nr. L 148 af 28. 6. 1968, s. 13.

<sup>(2)</sup> EFT nr. L 215 af 30. 7. 1992, s. 64.

<sup>(3)</sup> EFT nr. L 298 af 12. 11. 1985, s. 9.

<sup>(4)</sup> EFT nr. L 135 af 19. 5. 1992, s. 5.

<sup>(5)</sup> EFT nr. L 55 af 1. 3. 1988, s. 31.

<sup>(6)</sup> EFT nr. L 14 af 21. 1. 1992, s. 28.

<sup>(7)</sup> EFT nr. L 45 af 21. 2. 1990, s. 8.

**▼B**

Butteroil er sporet 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. februar 1993.

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

▼B

## BILAG

**BESTEMMELSE AF SITOSTEROL OG STIGMASTEROL I BUTTEROIL VED GASKROMATOGRAF I KAPILLARKOLONNE**

## 1. ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden består i en procedure til kvantitativ bestemmelse af sitosterol og stigmasterol i butteroil. Ved sitosterol forstås summen af  $\beta$ -sitosterol og 22-dihydro- $\beta$ -sitosterol, eftersom andre sitosteroler anses for at være uden betydning. Dette gælder for prøver, som er udtaget i henhold til forordning (EØF) nr. 3143/85, 570/88 og 429/90.

## 2. PRINCIP

Butteroil'en 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 forsøbning 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  $\times$  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  $\pm 1^\circ\text{C}$
  - 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  $\mu\text{m}$ ; 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  $\mu\text{m}$  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. Laboratorie-

▼B

personalet 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 standardopløsninger 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 prøveglass (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 prøveglass (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. Der afvejes 1 g buteroil ( $W_2$ ), 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. Scaleren 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 a 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 overskyende 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 trimethylsilylthere.
- 5.3.1. Den resterende etheropløsning i kolben hældes i et 2 ml prøveglass (3.7) med 2 ml diethylether, og etheren afdampes med nitrogen. Kolben skylles med yderligere to hold diethylether a 2 ml. Indholdet hældes hver gang over i prøveglasset, og etheren afdampes med nitrogen.

**▼B**

- 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 en minut, inden den indsprøjtes i gaskromatografen. Referencopløsningerne silyleres på samme måde som prøverne. Opløsningen til kontrol af adskillelseevnen (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
— hydrogencyk	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 ses, hvordan et kromatogram af en silyleret opløsning til kontrol af adskillelseevnen (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 begyndes med og efterfølges af indsprøjtning af standardopløsninger. Som hovedregel bør der indsprøjtes en standardopløsning efter en serie på seks prøveopløsninger.

*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.

**▼B**

## 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 d (5.2.1)

$P$  = renhedsgrad af sterolstandard (4.8 eller 4.9)

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

## 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 10,2 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 være større end 3,6 % af gennemsnittet af resultaterne.

- 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 25,3 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 8,9 % af gennemsnittet af resultaterne.

- 7.3. Kilde for bestemmelserne om præcision.

Bestemmelserne om præcision er fastlagt på grundlag af et eksperiment, som i 1991 blev foretaget med ni laboratorier og seks prøver (blindbestemmelse med tre dobbeltprøver) for stigmasterol; seks prøver (blindbestemmelse med tre dobbeltprøver) for sitosterol.

## 8. TOLERANCER

**▼M2**

- 8.1. Der udtages tre prøver af produktet med røbestof for at kontrollere, om iblandingen af røbestof i produktet er korrekt.

**▼B**

- 8.2. Stigmasterin.

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

**▼M2**

- 8.2.2. Resultaterne af analysen af de tre prøver af produktet anvendes til at kontrollere mængden og homogeniteten af det iblandede røbestof, og det laveste af disse resultater sammenholdes med følgende grænseværdier (under hensyntagen til den kritiske forskel for en 95 % sandsynlighedsgrænse (CrD95)):

**▼ M2**

- 120,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding for 95 % ren stigmasterol)
- 122,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding for 85 % ren stigmasterol)
- 84,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding for 95 % ren stigmasterol)
- 86,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding for 85 % ren stigmasterol).

Røbestofkoncentrationen i den prøve, der giver det laveste resultat, benyttes sammen med interpolering mellem henholdsvis 120,0 mg/kg og 84,0 mg/kg og 122,0 mg/kg og 86,0 mg/kg.

**▼ B**

8.3. Sitosterol.

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

**▼ M2**

8.3.2. Resultaterne af analysen af de tre prøver af produktet anvendes til at kontrollere mængden og renheden af det iblandede røbestof, og det laveste af disse resultater sammenholdes med følgende grænseværdier (under hensyntagen til den kritiske forskel for en 95 % sandsynlighedsgrænse (CrD95)):

- 486,0 mg/kg (95 % af den mindste iblanding for 90 % ren sitosterol)
- 358,0 mg/kg (70 % af den mindste iblanding for 90 % ren sitosterol).

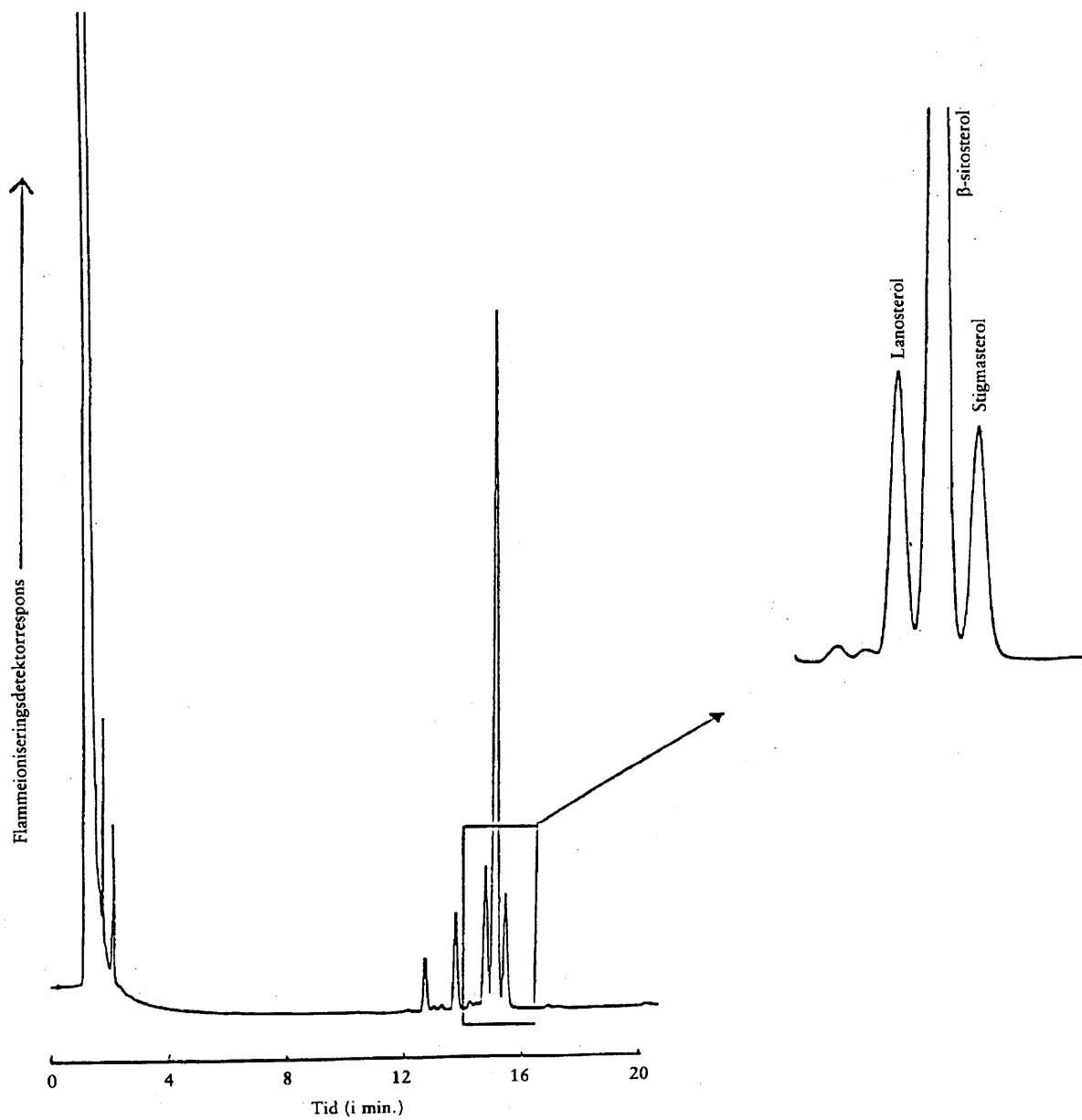
Røbestofkoncentrationen i den prøve, der giver det laveste resultat, benyttes sammen med interpolering mellem 486,0 mg/kg og 358,0 mg/kg.



## ▼B

Figur 1 Kromatogram af opløsning til kontrol af adskillelseevne

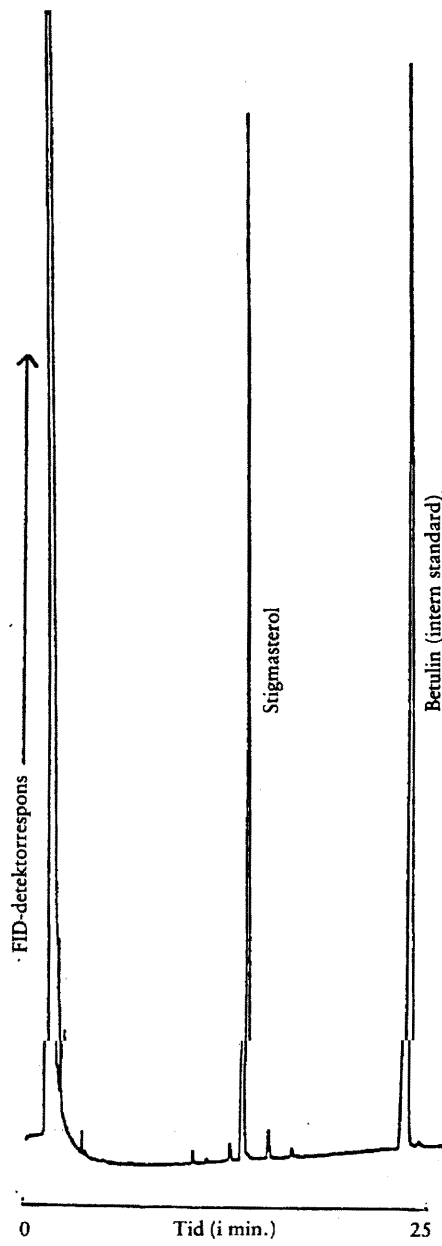
Det er bedst, hvis toppene er fuldstændig adskilt, dvs. at toppen for lanosterol går helt ned til basislinjen, før sitosteroltoppen begynder. En vis overlappning kan dog accepteres.



▼ B

Figur 2a

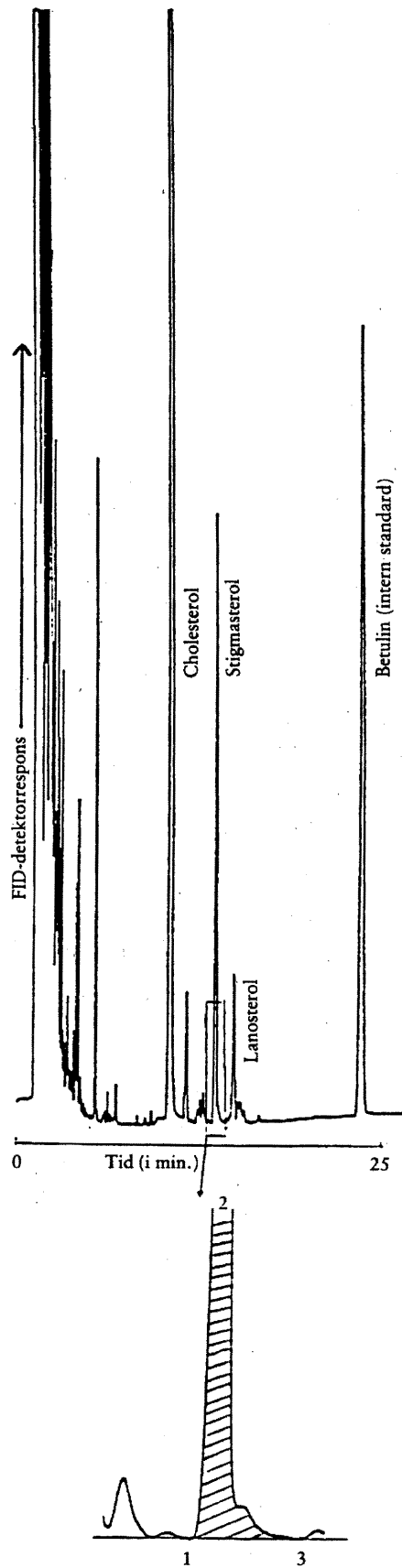
Stigmasterolstandardopløsning



▼B

Figur 2b

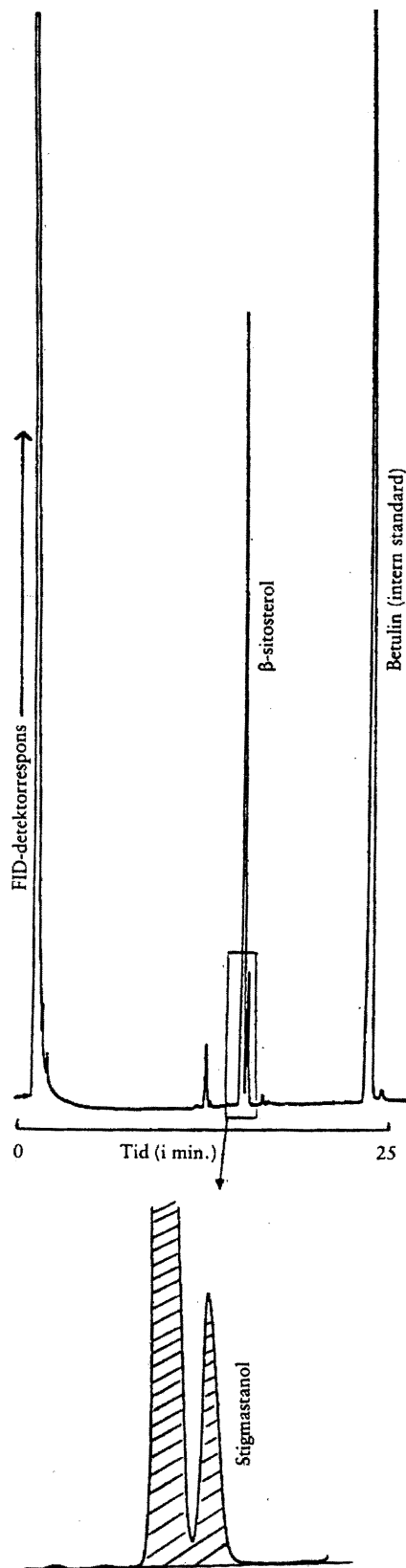
Butteroilprøve denatureret med stigmasterol



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

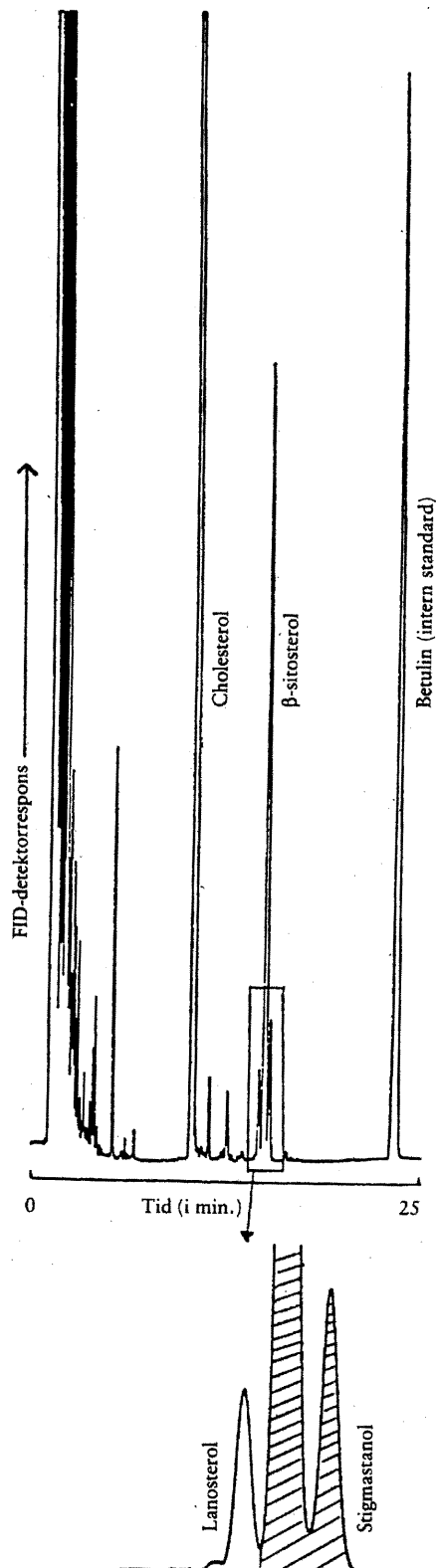
▼B

Figur 3a

 $\beta$ -sistosterolstandardopløsning

## ▼B

Figur 3b

Butteroilprøve denatureret med  $\beta$ -sitosterol

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