

Το έγγραφο αυτό συνιστά βοήθημα τεκμηρίωσης και δεν δεσμεύει τα κοινοτικά όργανα

► **B**

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 3942/92 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 22ας Δεκεμβρίου 1992

περί θεσπίσεως μεθόδου αναφοράς για τον προσδιορισμό σιτοστερόλης και στιγμαστερόλης στο βουτυρέλαιο

(ΕΕ L 399 της 31.12.1992, σ. 29)

Τροποποιείται από:

	Επίσημη Εφημερίδα		
	αριθ.	σελίδα	ημερομηνία
► M1 Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2539/93 της Επιτροπής της 15ης Σεπτεμβρίου 1993	L 233	1	16.9.1993
► M2 Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 175/1999 της Επιτροπής της 26ης Ιανουαρίου 1999	L 20	22	27.1.1999



ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 3942/92 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 22ας Δεκεμβρίου 1992

περί θεσπίσεως μεθόδου αναφοράς για τον προσδιορισμό σιτοστερόλης και στιγμαστερόλης στο βουτυρέλαιο

ΤΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας,

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

Εκτιμώντας:

ότι το βουτυρέλαιο πρέπει να ιχνηθετείται και το ιχνηθετημένο βουτυρέλαιο πρέπει να ελέγχεται σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 3143/85 της Επιτροπής ⁽³⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1264/92 ⁽⁴⁾, και ιδίως τα άρθρα 5 και 6·

ότι το βουτυρέλαιο ενδέχεται να ιχνηθετηθεί και τα ιχνηθετημένα προϊόντα πρέπει να ελέγχονται σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 570/88 της Επιτροπής ⁽⁵⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 124/92 ⁽⁶⁾, και ιδίως τα άρθρα 3 και 6·

ότι το βουτυρέλαιο πρέπει να ιχνηθετείται και το ιχνηθετημένο βουτυρέλαιο πρέπει να ελέγχεται σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 429/90 της Επιτροπής ⁽⁷⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 1264/92, και ιδίως τα άρθρα 10 και 11·

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

ότι λαμβανομένης υπόψη της σημασίας της ιχνηθέτησης για τη σωστή λειτουργία των εν λόγω σχεδίων είναι αναγκαίο να θεσπιστούν κοινοί μέθοδοι για τον εντοπισμό όλων των ιχνηθετών που απαιτούνται από τα εν λόγω σχέδια που εφαρμόζονται κατά τον ίδιον τρόπο σε όλην την Κοινότητα·

ότι κατ' αυτόν τον τρόπο θα εξασφαλισθεί κυρίως ίση μεταχείριση όλων των συναλλασσόμενων φορέων που έχουν πρόσβαση στα σχέδια αυτά και θα εξαλειφθούν άνισοι όροι ανταγωνισμού που ενδέχεται να προκύπτουν προς το παρόν λόγω διαφορετικών εθνικών μεθόδων ανάλυσης·

ότι είναι δύσκολο να θεσπιστούν τέτοιοι μέθοδοι αναφοράς για όλους τους ιχνηθέτες ταυτόχρονα· ότι η θέσπιση μεθόδου αναφοράς για τον προσδιορισμό στιγμαστερόλης και σιτοστερόλης στο βουτυρέλαιο αποτελεί ένα πρώτο βήμα προς τη κατεύθυνση αυτή·

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

⁽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 298 της 12. 11. 1985, σ. 9.

⁽⁴⁾ ΕΕ αριθ. L 135 της 19. 5. 1992, σ. 5.

⁽⁵⁾ ΕΕ αριθ. L 55 της 1. 3. 1988, σ. 31.

⁽⁶⁾ ΕΕ αριθ. L 14 της 21. 1. 1992, σ. 28.

⁽⁷⁾ ΕΕ αριθ. L 45 της 21. 2. 1990, σ. 8.

▼B

ΕΞΕΛΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

*Άρθρο 1***▼M1**

Η αναλυτική μέθοδος αναφοράς για τον καθορισμό της περιεκτικότητας του βουτυρελαίου σε στιγμαστερόλη, σύμφωνα με το άρθρο 6 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 3143/85, το άρθρο 6 ►**M2** του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2571/97 ◀ ή το άρθρο 11 του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 429/90, καθώς επίσης και της περιεκτικότητάς του σε β-σιτοστερόλη σύμφωνα με το άρθρο 6 ►**M2** του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2571/97 ◀, διευκρινίζεται στο παράρτημα.

▼B

Το βουτυρέλαιο θεωρείται ορθά ιχνηθετημένο εάν τα ληφθέντα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τις απαιτήσεις που ορίζονται στη παράγραφο 8 του παρόντος παραρτηματος.

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 Φεβρουαρίου 1993.

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



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΙΤΟΣΤΕΡΟΛΗΣ Ή ΣΤΙΓΜΑΣΤΕΡΟΛΗΣ ΣΕ ΒΟΥΤΥΡΕΛΑΙΟ ΜΕ ΑΕΡΙΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗΛΗΣ

1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Η μέθοδος περιγράφει μια διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού σιτοστερόλης ή στιγμαστερόλης σε βουτυρέλαιο. Ως σιτοστερόλη λαμβάνεται το άθροισμα της β-σιτοστερόλης και της 22-διυδρο-β-σιτοστερόλης· άλλες σιτοστερόλες θεωρούνται αμελητέες. Εφαρμόζεται σε δείγματα ληφθέντα σύμφωνα με τους κανονισμούς (ΕΟΚ) αριθ. 3143/85, (ΕΟΚ) αριθ. 570/88 και (ΕΟΚ) αριθ. 429/90.

2. ΑΡΧΗ

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

Οι στερόλες μετατρέπονται σε τριμεθυλο-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 εσφυρισμένο κάθετο ψυκτήρα.
- 3.2. Χοάνες διαχωρισμού των 500 ml.
- 3.3. Φιάλες των 250 ml.
- 3.4. Χοάνες εξισορρόπησης πίεσης των 250 ml ή παρεμφερείς, προς συλλογή του απορριπτόμενου διαιθυλαιθέρα.
- 3.5. Υάλινη στήλη των 350 mm × 20 mm, εφοδιασμένη 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 $\pm 1^\circ\text{C}$,
 - 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 πυρίτι (fused-silica) πλήρως επικαλυμμένη BP 1 ή ισοδύναμο σε ομοιόμορφο πάχος 0,25 μm· η στήλη πρέπει να είναι ικανή να διαχωρίζει τριμεθυλο-σίλυλο παράγωγα λανοστερόλης και σιτοστερόλης· κατάλληλη είναι στήλη BP 1 μήκους 12 m και εσωτερικής διαμέτρου 0,2 mm.
- 3.10. Μικροσύριγγα του 1 μl για αέρια χρωματογραφία, 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 μέχρι ενός λίτρου με νερό.
- 4.3. Βετουλίνη καθαρότητας τουλάχιστον 99 %.
 - 4.3.1. Διαλύματα εσωτερικού πρότυπου. Βετουλίνη σε διαιθυλαιθέρα (4.4).

▼B

- 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 (αηηλλαγμένος υπεροξειδίων ή υπολειμμάτων).
- 4.5. Θεικό νάτριο, άνυδρο, κοκκώδες, προξηρανθέν στους 102 °C επί δύο ώρες.
- 4.6. Αντιδραστήριο σιλυλίσωσης, για παράδειγμα TRI-SIL (διαθέσιμο από την PIERCE CHEMICAL CO, CAT No 49001) ή ισοδύναμο (προσοχή: το TRI-SIL είναι εύφλεκτο, τοξικό, διαβρωτικό και πιθανώς καρκινογόνο. Το εργαστηριακό 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 βαθμολογία πρότυπων ουσιών πρέπει να προσδιοριστεί 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 συγκεντρώσεις 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 τη 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 σαπωνοποιησίων.
- 5.2.1. Ζυγίζεται, με προσέγγιση 1 mg, 1 g περίπου βουτυρέλαιου (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 περίπου, 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 ανάμιξη. 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 διαχωρι-

▼B

στική 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 εκπλύσεις με νερό (10 αναστροφές). Η τρίτη έκπλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ζωηρή ανάδευση επί 30 δευτερόλεπτα. Εάν σχηματιστεί γαλάκτωμα μπορεί να διασπασθεί με τη 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 με δύο ακόμα 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 ενεθεί 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 συμπεριληφθεί 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 (split) 10: 1 έως 50: 1, ο λόγος διαχωρισμού (split ratio) πρέπει να βελτιστοποιηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και κατόπιν να επαληθευθεί η γραμμικότητα της απόκρισης του ανιχνευτή στην περιοχή συγκεντρώσεων που ενδιαφέρει.

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

— ποσότητα ενιόμενης ουσίας: 1 μl διαλύματος TMSE.

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

▼B

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

- 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. Πορεία ανάλυσης

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

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

Ενίεται 1 μl σιλυλιωμένου πρότυπου δείγματος και μετρώνται τα εμβαδά των κορυφών. Κάθε σειρά χρωματογραφικών αναλύσεων πρέπει να παρεμβάλλεται μεταξύ αναλύσεων προτύπων. Κατά κανόνα έξι ενέσεις 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 εκλύεται αμέσως μετά τη σιτοστερόλη, βλ. 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 :

$$R_1 = \frac{\text{Μέσος όρος εμβαδού κορυφών στερολών στο πρότυπο}}{\text{Μέσος όρος εμβαδού κορυφών βετουλίνης στο πρότυπο}}$$

Προσδιορίζεται το εμβαδόν της κορυφής της στερόλης (στιγμαστερόλης ή σιτοστερόλης) και της κορυφής της 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) περιεχόμενη 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).

Περιεκτικότητα του δείγματος σε στερόλη mg/kg

$$= \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10..$$

▼B

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 10,2 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 το 3,6 % του μέσου όρου των προσδιορισμών.

7.2. Αναπαραγωγιμότητα

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 25,3 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 8,9 % του μέσου όρου των προσδιορισμών.

7.3. Πηγή δεδομένων ακριβείας

Τα δεδομένα ακριβείας προσδιορίστηκαν σε πείραμα εκτελεσθέν το 1991, που περιλάμβανε εννέα εργαστήρια, έξι δείγματα (τρία τυφλά) στιγμαστερόλης και 6 δείγματα (τρία τυφλά) σιτοστερόλης.

8. ΟΡΙΑ ΑΝΟΧΗΣ

▼M2

- 8.1. Πρέπει να λαμβάνονται τρία δείγματα από το ιχνηθετημένο προϊόν, ώστε να ελέγχεται η ορθή ιχνηθέτηση του προϊόντος.

▼B

8.2. Στιγμαστερόλη

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

▼M2

- 8.2.2. Οι τιμές των τριών δειγμάτων που λαμβάνονται από την ανάλυση του προϊόντος το οποίο χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί το ποσοστό και η ομοιογένεια της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και η χαμηλότερη από αυτές συγκρίνεται με τις ακόλουθες οριακές τιμές [λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε τιμή πιθανότητας 95 % (CrD95)]:

- 120,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 95 %),
- 122,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 85 %),
- 84,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 95 %),
- 86,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για στιγμαστερόλη καθαρότητας 85 %).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει το χαμηλότερο αποτέλεσμα χρησιμοποιείται μαζί με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 120,0 mg/kg και 84,0 mg/kg, ή 122,0 mg/kg και 86,0 mg/kg.

▼ M2**▼ B**

8.3. Σιτοστερόλη

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

▼ M2

8.3.2. Οι τιμές των τριών δειγμάτων που λαμβάνονται από την ανάλυση του προϊόντος χρησιμοποιούνται για έλεγχο του ποσοστού και της ομοιογένειας της ενσωμάτωσης του ιχνηθέτη και η χαμηλότερη από αυτές συγκρίνεται με τις ακόλουθες οριακές τιμές [λαμβανομένης υπόψη της κρίσιμης διαφοράς που αντιστοιχεί σε τιμή πιθανότητας 95 % (CrD95)]:

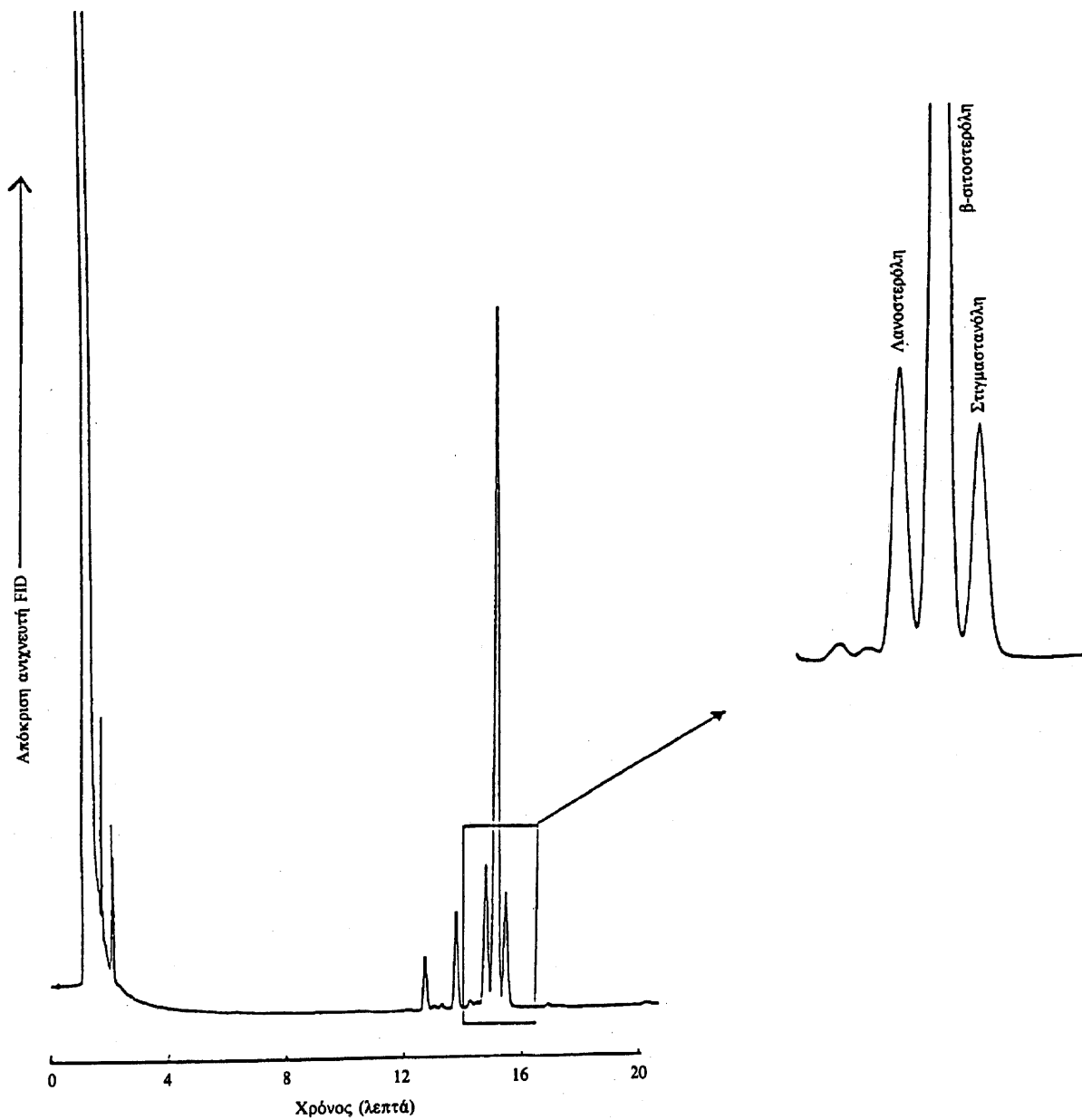
- 486,0 mg/kg (95 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για σιτοστερόλη καθαρότητας 90 %),
- 358,0 mg/kg (70 % του ελάχιστου ποσοστού ενσωμάτωσης για σιτοστερόλη καθαρότητας 90 %).

Η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στο δείγμα από το οποίο προκύπτει η χαμηλότερη τιμή χρησιμοποιείται μαζί με παρεμβολή μεταξύ των τιμών 486,0 mg/kg και 358,0 mg/kg.

▼B

Σχήμα 1: Χρωματογράφημα μείγματος ελέγχου διαχωριστικής ικανότητας

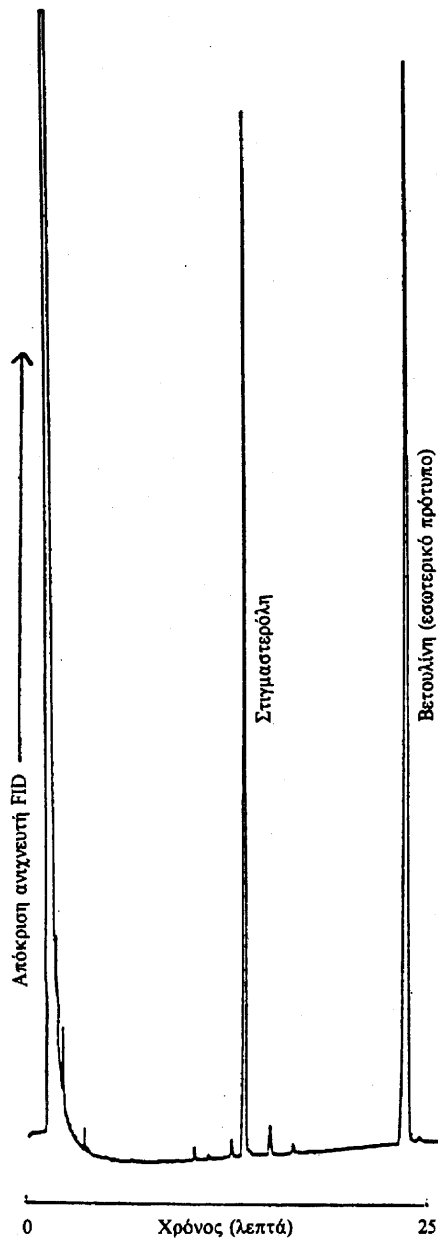
Προτιμάται ο πλήρης διαχωρισμός, δηλαδή το περίγραμμα της κορυφής της λανοστερόλης πρέπει να επιστρέφει στη γραμμή βάσης πριν αρχίσει η κορυφή της σιτοστερόλης, αν και είναι ανεκτός μη πλήρης διαχωρισμός.



▼ B

Σχήμα 2α:

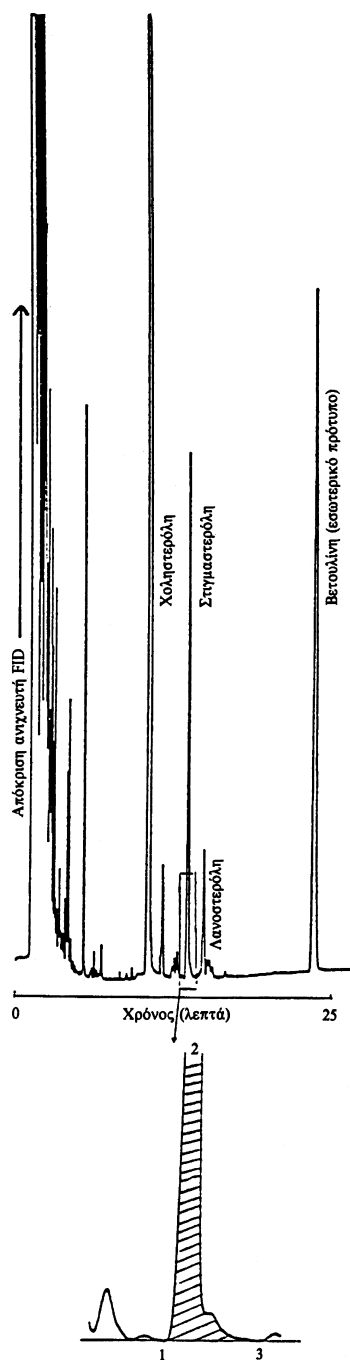
Πρότυπο σιγμαστερόλης



▼B

Σχήμα 2β:

Δείγμα βουτυρέλαιου μετουσιωμένο με στιγμαστερόλη

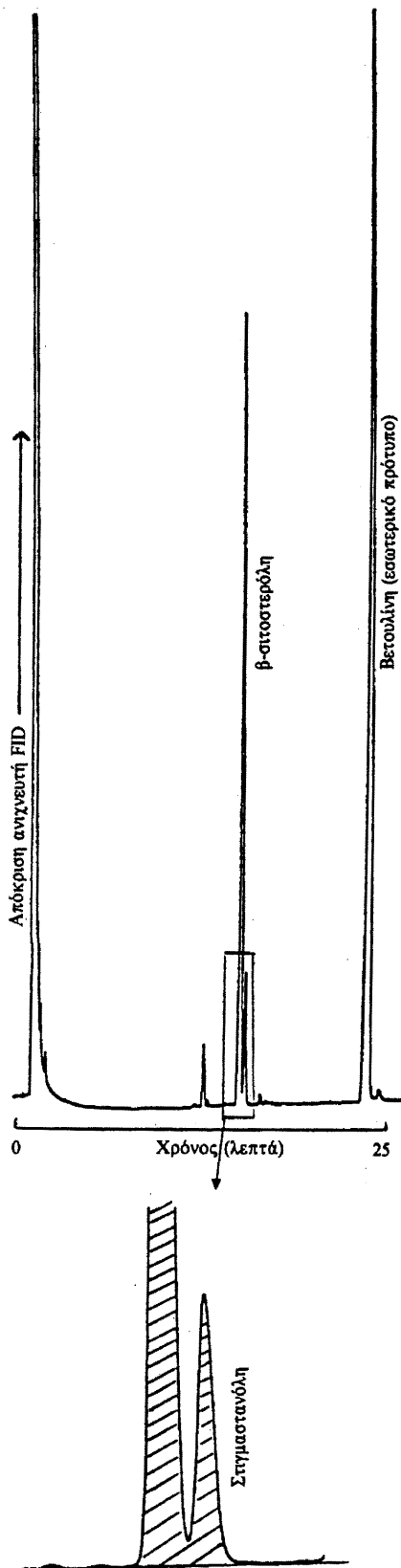


Σημείωση: Η ολοκλήρωση της κορυφής της στιγμαστερόλης πρέπει να συμπεριλαμβάνει κάθε τυχόν τμήμα «ουράς» όπως ορίζεται από τα σημεία 1, 2 και 3.

▼B

Σχήμα 3α:

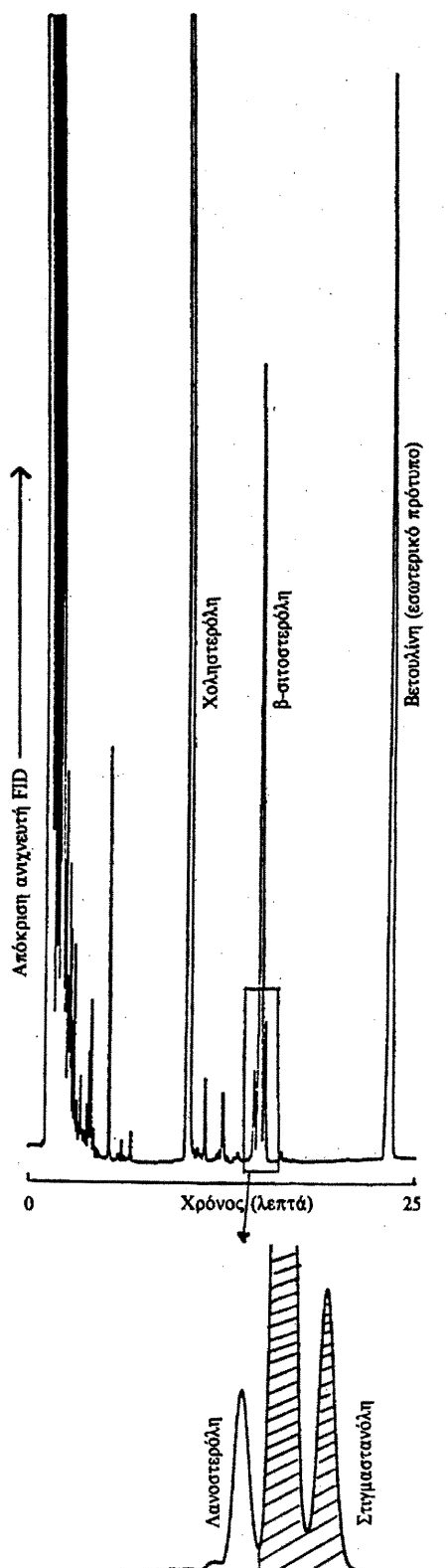
Πρότυπο σιτοστερόλης



▼ B

Σχήμα 3β:

Δείγμα βουτυρέλαιου μετουσιωμένο με β-σιτοστερόλη



Σημείωση: Η β-σιτοστερόλη συχνά περιέχει μία προσμείξη (ταυτοποιηθείσα ως στιγμαστερόλη. Τα επιβάδα των δύο αυτών κορυφών πρέπει να προστίθενται κατά τον υπολογισμό της ολικής β-σιτοστερόλης.