

VERORDENING (EEG) Nr. 3942/92 VAN DE COMMISSIE

van 22 december 1992

houdende vaststelling van een referentiemethode voor de bepaling van sitosterol en stigmasterol in boterolie

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op Verordening (EEG) nr. 804/68 van de Raad van 27 juni 1968 houdende een gemeenschappelijke ordening der markten in de sector melk en zuivelprodukten⁽¹⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 2071/92⁽²⁾, met name op artikel 6,Overwegende dat overeenkomstig Verordening (EEG) nr. 3143/85 van de Commissie⁽³⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 1264/92⁽⁴⁾, met name de artikelen 5 en 6, aan boterolie verklikstoffen moeten worden toegevoegd en de boterolie met verklikstoffen aan controle moet worden onderworpen;Overwegende dat overeenkomstig Verordening (EEG) nr. 570/88 van de Commissie⁽⁵⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 124/92⁽⁶⁾, met name de artikelen 3 en 6, aan boterolie verklikstoffen kunnen worden toegevoegd en de produkten met verklikstoffen aan controle moeten worden onderworpen;Overwegende dat overeenkomstig Verordening (EEG) nr. 429/90 van de Commissie⁽⁷⁾, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 1264/92, met name de artikelen 10 en 11, aan boterolie verklikstoffen moeten worden toegevoegd en de boterolie met verklikstoffen aan controle moet worden onderworpen;

Overwegende dat strikte naleving van de bepalingen voor het gebruik van verklikstoffen in boterolie essentieel is om frauduleus gebruik van gesubsidieerde boter te voorkomen;

Overwegende dat het, gezien het belang van verklikstoffen voor een goede werking van de regelingen, nodig is gemeenschappelijke in de hele Gemeenschap op dezelfde

wijze toe te passen methoden vast te stellen voor het opsporen van alle voor deze regelingen vereiste verklikstoffen; dat dit met name een gelijke behandeling zou waarborgen van alle bedrijven die gebruik maken van deze regelingen en een einde zou maken aan ongelijke concurrentievoorwaarden die thans het gevolg kunnen zijn van verschillende analysemethoden;

Overwegende dat het moeilijk is dergelijke referentiemethoden voor alle verklikstoffen tegelijk vast te stellen; dat de vaststelling van een referentiemethode voor de bepaling van stigmasterol en sitosterol in botervet een eerste stap in die richting is;

Overwegende dat de in deze verordening vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Comité van beheer voor melk en zuivelprodukten,

HEEFT DE VOLGENDE VERORDENING VASTGESTELD:

Artikel 1

Indien overeenkomstig respectievelijk artikel 6 van Verordening (EEG) nr. 3143/85, artikel 6 van Verordening (EEG) nr. 570/88 of artikel 11 van Verordening (EEG) nr. 429/90 het gehalte aan stigmasterol in boterolie moet worden bepaald, wordt de in de bijlage gespecificeerde referentieanalysemethode gebruikt. De referentiemethode wordt ook gebruikt, indien overeenkomstig artikel 6 van Verordening (EEG) nr. 570/88 het gehalte aan β -sitosterol in boterolie moet worden bepaald.

De toevoeging van verklikstoffen aan boterolie is op correcte wijze gebeurd, indien de verkregen resultaten in overeenstemming zijn met de onder punt 8 van deze bijlage gespecificeerde eisen.

Artikel 2

Deze verordening treedt in werking op de derde dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen*.

Zij is van toepassing met ingang van 1 februari 1993.

(1) PB nr. L 148 van 28. 6. 1968, blz. 13.

(2) PB nr. L 215 van 30. 7. 1992, blz. 64.

(3) PB nr. L 298 van 12. 11. 1985, blz. 9.

(4) PB nr. L 135 van 19. 5. 1992, blz. 5.

(5) PB nr. L 55 van 1. 3. 1988, blz. 31.

(6) PB nr. L 14 van 21. 1. 1992, blz. 28.

(7) PB nr. L 45 van 21. 2. 1990, blz. 8.

Deze verordening is verbindend in al haar onderdelen en is rechtstreeks toepasselijk in elke Lid-Staat.

Gedaan te Brussel, 22 december 1992.

Voor de Commissie

Ray MAC SHARRY

Lid van de Commissie

BIJLAGE

BEPALING VAN SITOSTEROL OF STIGMASTEROL IN BOTEROLIE MET BEHULP VAN CAPILLAIRE GASCHROMATOGRAFIE

1. DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

In deze methode wordt een werkwijze beschreven voor de kwantitatieve bepaling van sitosterol of stigmasterol in boterolie. Onder sitosterol wordt verstaan de totale hoeveelheid β -sitosterol en 22-dihydro- β -sitosterol; overige sitosterolen gelden als te verwaarlozen. De methode is van toepassing op monsters die krachtens de Verordeningen (EEG) nr. 3143/85, (EEG) nr. 570/88 en (EEG) nr. 429/90 worden ontvangen.

2. PRINCIPE

De boterolie wordt verzeept met ethanolische kaliumhydroxide-oplossing, waarna de onverzeepbare bestanddelen worden geëxtraheerd met diethylether.

De sterolen worden omgezet in trimethylsilylethers en met behulp van capillaire gaschromatografie kwantitatief bepaald, waarbij betulinol als interne standaard wordt gebruikt.

3. APPARATUUR

- 3.1. Kolf, 150 ml, voorzien van een refluxkoeler met slijpstukken.
- 3.2. Scheitrechters, 500 ml.
- 3.3. Kolven, 250 ml.
- 3.4. Tegendrukscheitrechters, 250 ml, of soortgelijke apparatuur voor het opvangen van gebruikte diethylether.
- 3.5. Glazen kolom, 350 mm \times 20 mm, met een filterplaat van gesinterd glas.
- 3.6. Waterbad of verwarmingsmantel.
- 3.7. Reactieflesjes, 2 ml.
- 3.8. Gaschromatograaf, geschikt voor het werken met een capillaire kolom, bestaande uit:
 - 3.8.1. een oven waarmee de kolommen op de gewenste temperatuur kunnen worden gehouden met een nauwkeurigheid van ± 1 °C;
 - 3.8.2. een injector met regelbare temperatuur;
 - 3.8.3. een vlamionisatiedetector met elektronische versterker;
 - 3.8.4. Elektronische rekenapparatuur (integrator), geschikt voor gebruik met een elektronische versterker (3.8.3).
- 3.9. Een fused-silica capillaire kolom, inwendig gecoat met BP1 of equivalent met een uniforme dikte van 0,25 μ m; met deze kolom moet resolutie van de trimethylsilyl-derivaten van lanosterol en sitosterol mogelijk zijn; hiervoor kan een BP1-kolom met een lengte van 12 m en een inwendige diameter van 0,2 mm worden gebruikt.
- 3.10. Injectiespuit, van ten hoogste 1 μ l, geschikt voor de injector (3.8.2).

4. REAGENTIA

Alle reagentia moeten p.a. zijn. Het gebruikte water dient gedestilleerd water of water van gelijkwaardige zuiverheid te zijn.

- 4.1. Ethanol, minimaal 95 % zuiver.
- 4.2. Kaliumhydroxide, oplossing van 60 %. Los 600 g kaliumhydroxide (minimaal 85 %) op in water en vul met water aan tot 1 liter.
- 4.3. Betulinol, minimaal 99 % zuiver.
 - 4.3.1. Interne standaard: oplossingen van betulinol in diethylether (4.4).

- 4.3.1.1. de concentratie van de betulinol-oplossing voor de bepaling van sitosterol moet 1,0 mg/ml zijn.
- 4.3.1.2. de concentratie van de betulinol-oplossing voor de bepaling van stigmasterol moet 0,4 mg/ml zijn.
- 4.4. Diethylether, p.a. (peroxide- en restvrij).
- 4.5. Natriumsulfaat, watervrij, 2 uur gedroogd bij 102 °C.
- 4.6. Silyleringsreagens, b.v. TRI-SIL (verkrijgbaar bij Pierce Chemical Co, Cat. nr. 49001) of gelijkwaardig. (WAARSCHUWING: TRI-SIL is ontvlambaar, toxisch, bijtend en mogelijkerewijs carcinogeen. Het laboratoriumpersoneel moet op de hoogte zijn van de veiligheidsvoorschriften voor de TRI-SIL en de nodige voorzorgsmaatregelen nemen.)
- 4.7. Lanosterol.
- 4.8. Sitosterol, bekende zuiverheid (P) minimaal 90 %.
- Opmerking 1:* De zuiverheid van het voor de ijking gebruikte standaardmateriaal moet volgens de interne normalisatiemethode worden bepaald. Neem aan dat alle in het monster aanwezige sterolen in het chromatogram voorkomen, dat het totale piekoppervlak overeenkomt met 100 % van de sterol-bestanddelen en dat de detector voor alle sterolen dezelfde respons geeft. Controleer of het systeem op het bij de analyse gebruikte concentratiebereik lineair is.
- 4.8.1. Sitosterol-standaardoplossing: bereid een oplossing die, tot op 0,001 mg/ml nauwkeurig, ongeveer 0,5 mg/ml (W_1) sitosterol (4.8) in diethylether (4.4) bevat.
- 4.9. Stigmasterol, bekende zuiverheid (P) minimaal 90 %.
- 4.9.1. Stigmasterol-standaardoplossing: bereid een oplossing die, tot op 0,001 mg/ml nauwkeurig, ongeveer 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterol (4.9) in diethylether (4.4) bevat.
- 4.10. Mengsel voor controle van de resolutie: bereid een oplossing die 0,05 mg/ml lanosterol (4.7) en 0,5 mg/ml sitosterol (4.8) in diethylether (4.4) bevat.

5. WERKWIJZE

- 5.1. Bereiding van de standaardoplossingen voor chromatografie: de interne standaardoplossing (4.3.1) moet op hetzelfde moment aan de desbetreffende standaardoplossing met sterolen en aan het verzepte monster (5.2.2) worden toegevoegd.
- 5.1.1. Standaardoplossing sitosterol voor chromatografie: breng 1 ml van de standaardoplossing sitosterol (4.8.1) in elk van twee reactieflesjes (3.7) en verdamp de diethylether met een stikstofstroom. Voeg 1 ml interne standaardoplossing (4.3.1.1) toe en verdamp de diethylether met een stikstofstroom.
- 5.1.2. Standaardoplossing stigmaterol voor chromatografie: breng 1 ml van de standaardoplossing stigmasterol (4.9.1) in elk van de twee reactieflesjes (3.7) en verdamp de diethylether met een stikstofstroom. Voeg 1 ml interne standaardoplossing (4.3.1.2) toe en verdamp de diethylether met een stikstofstroom.
- 5.2. Bereiding van de onverzeepbare bestanddelen.
- 5.2.1. Weeg tot op 1 mg nauwkeurig ongeveer 1 g boterolie (W_2) af in een kolf van 150 ml (3.1). Voeg 50 ml ethanol (4.1) en 10 ml kaliumhydroxide-oplossing (4.2) toe. Bevestig de refluxkoeler, verwarm tot ongeveer 75 °C en handhaaf deze temperatuur gedurende 30 minuten. Verwijder de koeler en laat de kolf afkoelen tot kamertemperatuur.
- 5.2.2. Voeg 1,0 ml interne standaardoplossing toe (4.3.1.1 als sitosterol wordt bepaald of 4.3.1.2 als stigmasterol wordt bepaald). Meng zorgvuldig en breng de inhoud van de kolf kwantitatief over in een scheidrecter van 500 ml (3.2), waarna de kolf achtereenvolgens wordt gewassen met 50 ml water en 250 ml diethylether (4.4) Schud de scheidrecter krachtig gedurende 2 minuten en wacht tot de fasen gescheiden zijn. Laat de waterige onderlaag wegllopen en was de etherlaag door viermaal te schudden met 100 ml water.

Opmerking 2: Om emulsievorming te voorkomen moet het wassen met water de eerste twee maal voorzichtig gebeuren (tienmaal omkeren). De derde maal kan gedurende 30 seconden krachtig worden geschud. Indien er een emulsie ontstaat, kan deze worden afgebroken door 5-10 ml ethanol toe te voegen. Indien ethanol wordt toegevoegd, moet er nog eens tweemaal krachtig met water worden gewassen.

- 5.2.3. Laat de heldere zeepvrije etherlaag door een glazen kolom (3.5) met 30 g watervrij natriumsulfaat (4.5) lopen. Vang de ether op in een kolf van 250 ml (3.3). Voeg een kooksteentje toe en damp de oplossing vrijwei droog op een waterbad of met een verwarmingsmantel. Zorg er daarbij voor dat het verdampende oplosmiddel wordt opgevangen.
- Opmerking 3:* Als de vloeistof bij een te hoge temperatuur volledig wordt ingedampt, is het mogelijk dat er ook sterolen verloren gaan.
- 5.3. Bereiding van de trimethylsilylethers
- 5.3.1. Breng de in de kolf resterende etheroplossing over in een reactieflesje van 2 ml (3.7) met 2 ml diethylether en verdamp de ether met een stikstofstroom. Was de kolf tweemaal als volgt: breng 2 ml diethylether in de kolf, breng deze over naar het reactieflesje en verdamp de ether met stikstof.
- 5.3.2. Silyleer het monster door 1 ml TRI-SIL (4.6) toe te voegen. Sluit het vat af en schud krachtig om de sterolen op te lossen. Verwarm, als de sterolen niet volledig oplossen, tot 65–70 °C. Laat de oplossing gedurende ten minste 5 minuten staan alvorens deze in de gaschromatograaf te injecteren. Silyleer de standaarden (5.1.1 of 5.1.2) en het mengsel om de resolutie te controleren (4.10) op dezelfde manier als de monsters.
- Opmerking 4:* Het silyleren moet in een water vrije omgeving gebeuren. Wanneer betulinol onvolledig is gesilyleerd, verschijnt er vlak bij de betulinol-piek een tweede piek.
- Het silyleringsproces wordt gestoord door de aanwezigheid van ethanol in de oplossing, die een gevolg kan zijn van onvoldoende wassen na de extractie. Indien dit probleem aanhoudt, was dan na de extractie een vijfde maal, waarbij gedurende 30 seconden krachtig wordt geschud.
- 5.4. Gaschromatografie
- 5.4.1. Keuze van de werkomstandigheden:
- Volg voor de instelling van de gaschromatograaf de instructies van de fabrikant op.
- Voor de werkomstandigheden gelden de volgende richtlijnen:
- kolomtemperatuur: 265 °C
 - injectortemperatuur: 280 °C
 - detectortemperatuur: 300 °C
 - stroomsnelheid draaggas: 0,6 ml/minuut
 - waterstofdruk: 84 kPa
 - luchtdruk: 155 kPa
 - splitverhouding: van 10:1 tot 50:1; de splitverhouding moet volgens de instructies van de fabrikant worden geoptimaliseerd en vervolgens moet worden gecontroleerd of de respons van de detector op het gebruikte concentratiebereik lineair is.
- Opmerking 5:* Het is vooral belangrijk dat de liner van de injector regelmatig wordt schoongemaakt.
- geïnjecteerde hoeveelheid: 1 µl TMSE-oplossing
- Laat het systeem equilibreren en begin niet met de analyse voordat de respons voldoende stabiel is.
- Stel de omstandigheden, die afhankelijk van de kenmerken van de kolom en de gaschromatograaf zijn, zodanig in, dat er chromatogrammen worden verkregen die aan de volgende eisen voldoen:
- de resolutie tussen de sitosterol-piek en de lanosterol-piek moet afdoende zijn. Bij een gesilyleerd mengsel voor controle op de resolutie (4.10) moet een soortgelijk chromatogram worden verkregen als in figuur 1 is weergegeven
 - voor onderstaande sterolen moet ongeveer de daarbij vermelde relatieve retentietijd worden verkregen:

Cholesterol:	1,0
Stigmasterol:	1,3
Sitosterol:	1,5
Betulinol:	2,5
 - de retentietijd voor betulinol moet ongeveer 24 minuten zijn.
- 5.4.2. Analyse
- Injecteer 1 µl gesilyleerde standaardoplossing (stigmasterol of sitosterol) en stel de kalibratieparameters van de integrator in.
- Injecteer 1 µl gesilyleerde standaardoplossing om de responsfactor in vergelijking met betulinol te bepalen.

Injecteer 1 µl gesilyleerde monsteroplossing en meet de piekoppervlakken. Voor en na elke chromatografische reeks moet er 1 µl standaardoplossing worden geïnjecteerd. Als leidraad kan worden gesteld dat vóór en na elke reeks van 6 monsteroplossingen, de standaardoplossing wordt geïnjecteerd.

Opmerking 6: Bij de integratie van de stigmasterol-piek moet ook het oppervlak van eventuele staarten, zoals aangegeven bij de punten 1, 2 en 3 in figuur 2b, worden meegerekend.

Wanneer de totale hoeveelheid sitosterol wordt bepaald, moet bij de integratie van de sitosterol-piek ook het oppervlak van de piek van 22-dihydro-β-sitosterol (stigmastanol), dat vlak na sitosterol elueert, worden meegerekend.

6. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- 6.1. Bepaal het oppervlak van de sterol-pieken en de betulinol-pieken bij de standaardoplossingen voor en na een reeks en bereken R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{Gemiddeld sterol-piekoppervlak in standaardoplossing}}{\text{Gemiddeld betulinol-piekoppervlak in standaardoplossing}}$$

Bepaal het oppervlak van de sterol-piek (stigmasterol of sitosterol) en de betulinol-piek in de monsteroplossing en bereken R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{Sterol-piekoppervlak in monsteroplossing}}{\text{Betulinol-piekoppervlak in monsteroplossing}}$$

W_1 = sterolconcentratie van de standaard in de standaardoplossing (4.8.1 of 4.9.1) in mg/ml

W_2 = gewicht van het monster (5.2.1) in g

P = zuiverheid van de standaard-sterol (4.8 of 4.9)

$$\text{Sterolgehalte van het monster (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10.$$

7. NAUWKEURIGHEID VAN DE METHODE

7.1. Herhaalbaarheid

7.1.1. Stigmasterol

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen, binnen een zo kort mogelijke tijd uitgevoerd door dezelfde persoon met dezelfde apparatuur op hetzelfde monster, mag niet groter zijn dan 10,2 mg/kg.

7.1.2. Sitosterol

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen, binnen een zo kort mogelijke tijd uitgevoerd door dezelfde persoon met dezelfde apparatuur op hetzelfde monster, mag niet groter zijn dan 3,6 % van het gemiddelde van de bepalingen.

7.2. Reproduceerbaarheid

7.2.1. Stigmasterol

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen, uitgevoerd door personen in verschillende laboratoria met verschillende apparatuur op hetzelfde monster, mag niet groter zijn dan 25,3 mg/kg.

7.2.2. Sitosterol

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen, uitgevoerd door personen in verschillende laboratoria met verschillende apparatuur op hetzelfde monster, mag niet groter zijn dan 8,9 % van het gemiddelde van de bepalingen.

7.3. Herkomst van de precisiegegevens

De precisiegegevens zijn vastgesteld op basis van een experiment dat in 1991 in negen laboratoria werd uitgevoerd met zes monsters (drie blinde duplo's) voor stigmasterol en zes monsters (drie blinde duplo's) voor sitosterol.

8. TOLERANTIEGRENZEN

8.1. Om de homogeniteit te controleren moeten er van het produkt met verklikstoffen drie monsters worden genomen.

8.2. Stigmasterol

8.2.1. Het bijmengingsgehalte voor stigmasterol bedraagt 150 g met een zuiverheid van ten minste 95 % per ton boterolie, d.w.z. 142,5 mg/kg, of 170 g met een zuiverheid van ten minste 85 % per ton boterolie, d.w.z. 144,5 mg/kg.

8.2.2. Uitgaande van het kritische verschil — Critical Difference — bij een waarschijnlijkheid van 95 % (CrD_{95}) mag het gemiddelde van de drie resultaten niet lager zijn dan:

128,3 mg/kg voor bijmenging van 95 % zuiver stigmasterol, en

130,3 mg/kg voor bijmenging van 85 % zuiver stigmasterol.

8.2.3. Bovendien wordt de laagste bij analyse van het produkt verkregen uitkomst gebruikt om de homogeniteit van de verdeling van de verklikstof na te gaan. Dit wordt gedaan door vergelijking met de volgende grenswaarden:

— 120,4 mg/kg (95 % van het minimum-bijmengingsgehalte voor 95 % zuiver stigmasterol, op basis van één monster CrD_{95});

— 122,3 mg/kg (95 % van het minimum-bijmengingsgehalte voor 85 % zuiver stigmasterol, op basis van één monster CrD_{95});

— 99,0 mg/kg (80 % van het minimum-bijmengingsgehalte voor 95 % zuiver stigmasterol, op basis van één monster CrD_{95});

— 100,6 mg/kg (80 % van het minimum-bijmengingsgehalte voor 85 % zuiver stigmasterol, op basis van één monster CrD_{95});

De concentratie van de verklikstof in het monster dat het laagste resultaat oplevert, wordt gebruikt in combinatie met interpolatie tussen 120,4 mg/kg en 99,0 mg/kg, respectievelijk 122,3 mg/kg en 100,6 mg/kg.

8.3. Sitosterol

8.3.1. Het bijmengingsgehalte voor sitosterol bedraagt 600 g ten minste 90 % zuiver sitosterol per ton boterolie, d.w.z. 540 mg/kg.

8.3.2. Uitgaande van CrD_{95} mag het gemiddelde van de drie resultaten niet lager zijn dan 513,0 mg/kg.

8.3.3. Bovendien wordt de laagste bij analyse van het produkt verkregen uitkomst gebruikt om de homogeniteit van de verdeling van de verklikstof na te gaan. Dit wordt gedaan door vergelijking met de volgende grenswaarden:

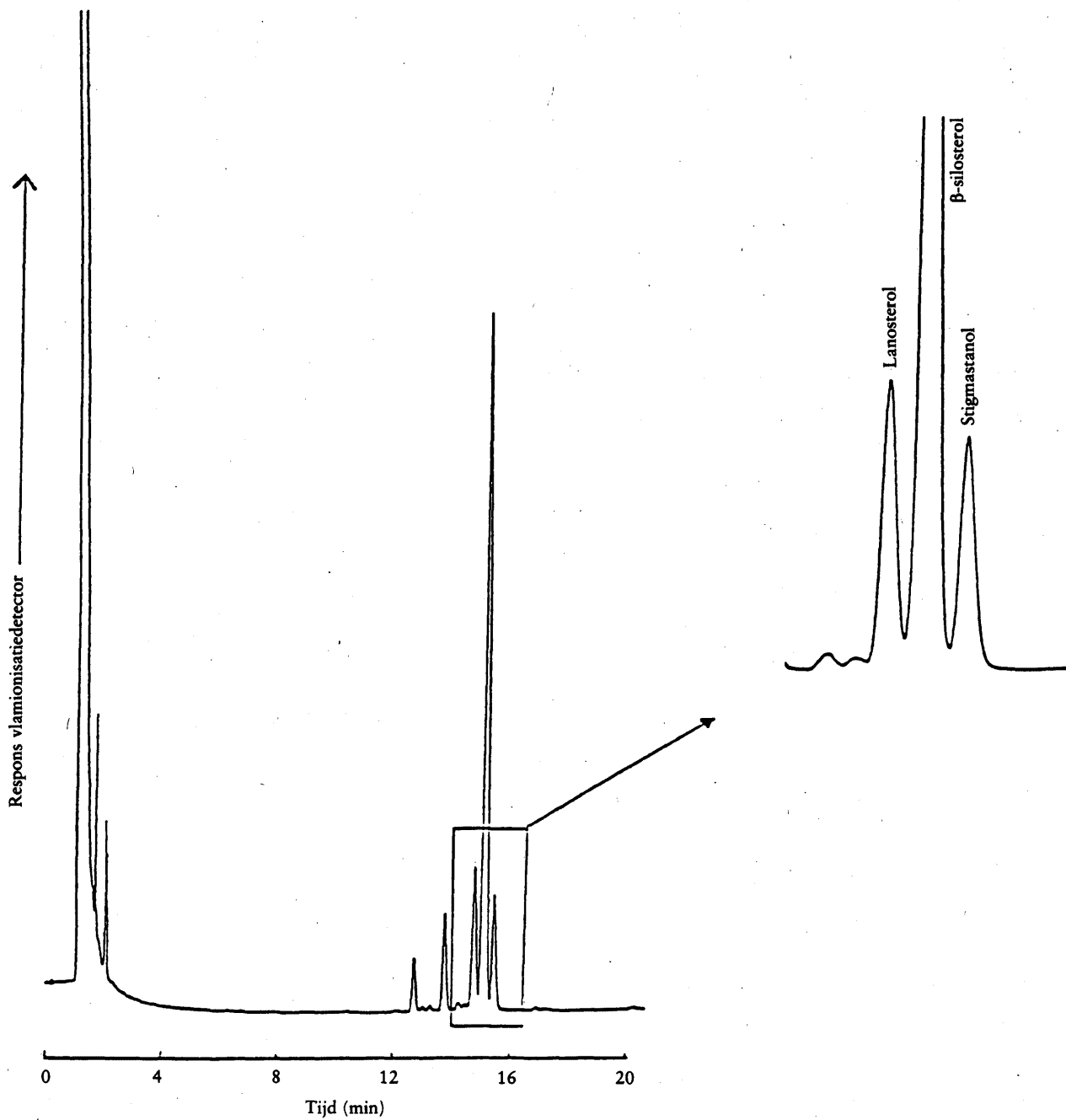
— 484,4 mg/kg (95 % van het minimum-bijmengingsgehalte voor 90 % zuiver stigmasterol, op basis van één monster CrD_{95});

— 403,4 mg/kg (80 % van het minimum-bijmengingsgehalte voor 90 % zuiver stigmasterol, op basis van één monster CrD_{95}).

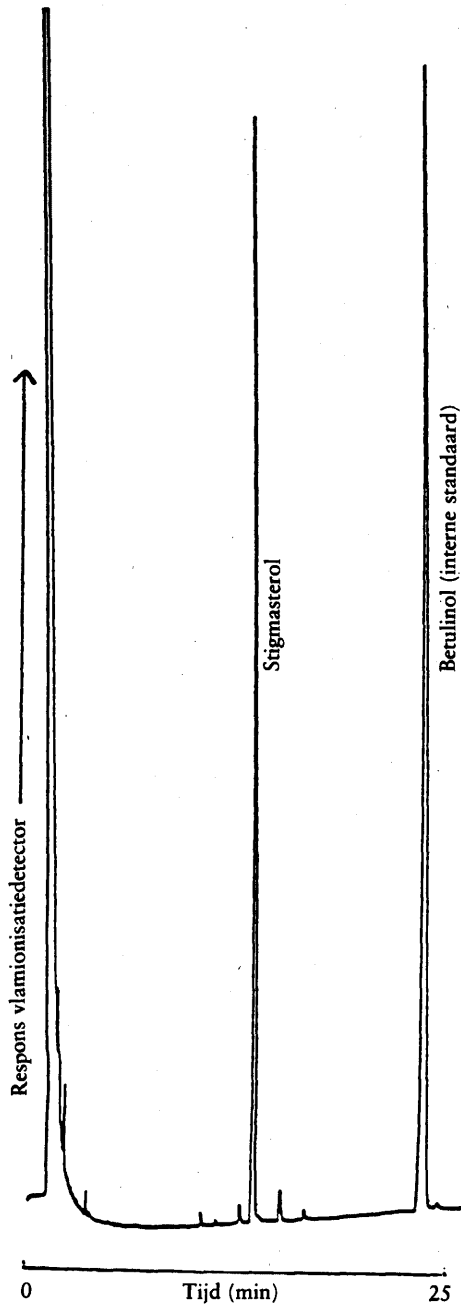
De concentratie van de verklikstof in het monster dat het laagste resultaat oplevert, wordt gebruikt in combinatie met interpolatie tussen 484,4 mg/kg en 403,4 mg/kg.

Figuur 1: Chromatogram van het mengsel voor controle van de resolutie

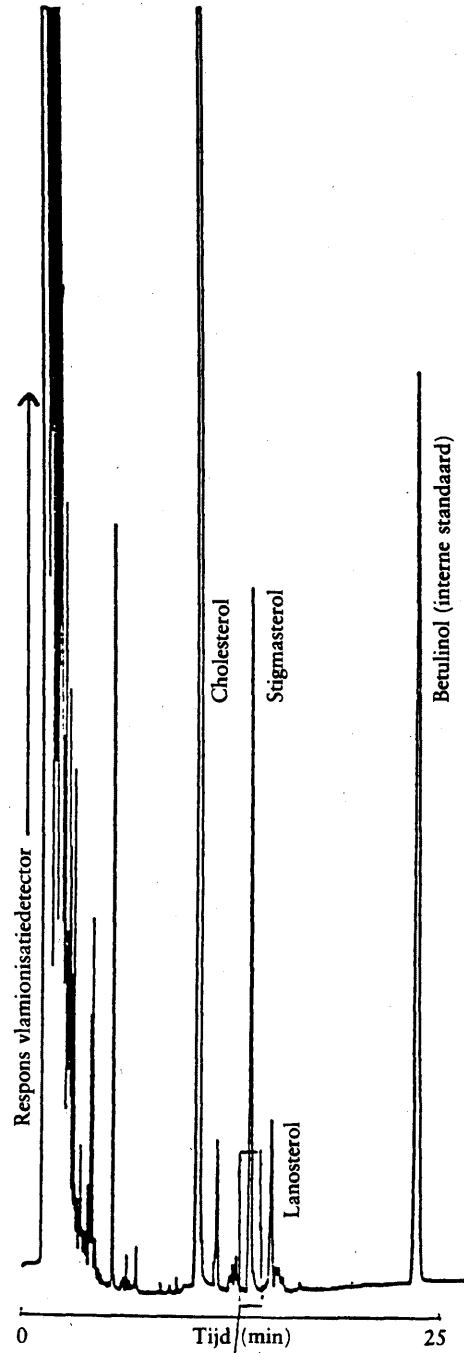
Volledige resolutie, waarbij de recorderpen na de piek van lanosterol op de basislijn terugkomt alvorens de piek voor sitosterol begint, verdient de voorkeur, maar onvolledige resolutie is aanvaardbaar.



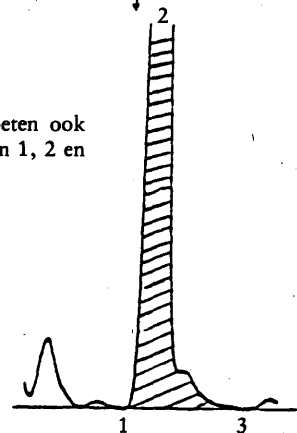
Figuur 2a:
Stigmasterol-standaard



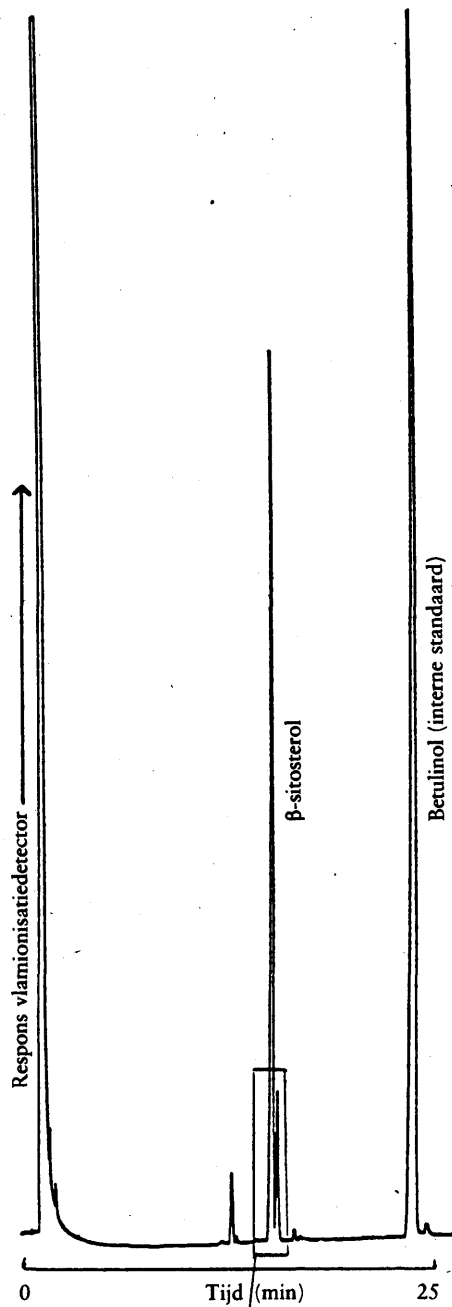
Figuur 2b:
Boterolie (boterconcentraat)-monster,
gedenatureerd met stigmasterol



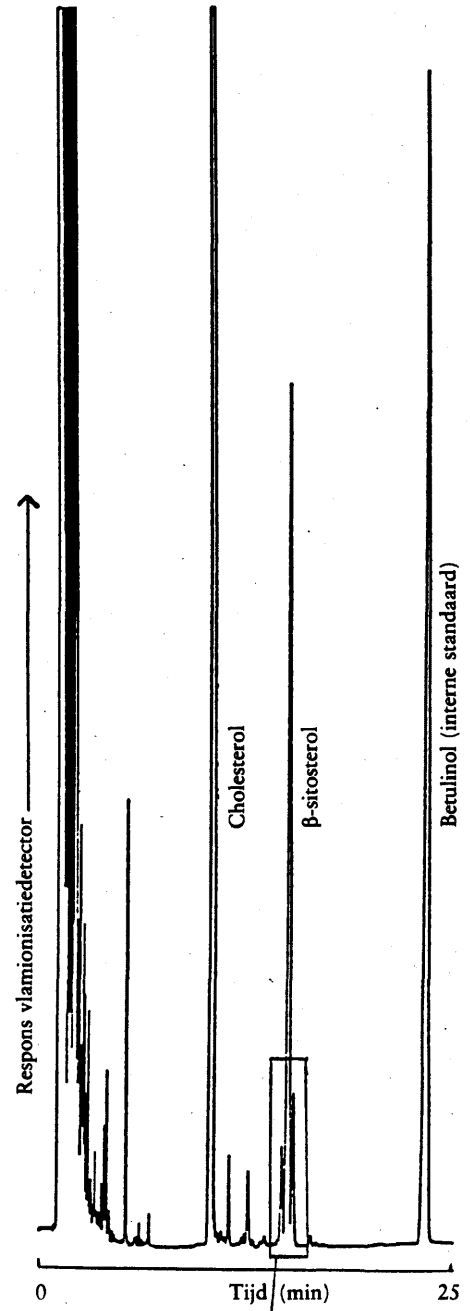
N.B.: Bij integratie van de piek voor stigmasterol moeten ook eventuele staarten, zoals aangegeven bij de punten 1, 2 en 3, worden meegerekend.



Figuur 3a:
β-sitosterol-standaard



Figuur 3b:
Boterolie (boterconcentraat)-monster,
gedenatureerd met β-sitosterol



N.B.: β-sitosterol bevat vaak een verontreiniging (stigmastanol) die onmiddellijk na β-sitosterol elueert. Wanneer de totale hoeveelheid β-sitosterol wordt bepaald, moeten de oppervlakken van deze twee pieken bij elkaar worden opgeteld.

