

Detta dokument är endast avsett som dokumentationshjälpmedel och institutionerna ansvarar inte för innehållet

► **B** **KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EEG) nr 3942/92**
av den 22 december 1992
om införande av en referensmetod för bestämning av sitosterol och stigmasterol i smörolja
(EGT L 399, 31.12.1992, s. 29)

Ändrad genom:

		Officiella tidningen		
		nr	sida	datum
► <u>M1</u>	Kommissionens förordning (EEG) nr 2539/93 av den 15 september 1993	L 233	1	16.9.1993
► <u>M2</u>	Kommissionens förordning (EG) nr 175/1999 av den 26 januari 1999	L 20	22	27.1.1999

▼B

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EEG) nr 3942/92**av den 22 december 1992****om införande av en referensmetod för bestämning av sitosterol och stigmasterol i smörolja**

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT
DENNA FÖRORDNING

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets förordning (EEG) nr 804/68 av den 27 juni 1968 om den gemensamma organisationen av marknaden för mjölk och mjölkprodukter ⁽¹⁾, senast ändrad genom förordning (EEG) nr 2071/92 ⁽²⁾, särskilt artikel 6 i denna, och

med beaktande av följande:

Smörolja skall vara försett med ett spårämne och den spårämnesförsedda smöroljan skall kontrolleras i enlighet med kommissionens förordning (EEG) nr 3143/85 ⁽³⁾, senast ändrad genom förordning (EEG) nr 1264/92 ⁽⁴⁾, särskilt artiklarna 5 och 6 i denna.

Smörolja får vara försett med ett spårämne och spårämnesförsedda produkter skall kontrolleras i enlighet med kommissionens förordning (EEG) nr 570/88 ⁽⁵⁾, senast ändrad genom förordning (EEG) nr 124/92 ⁽⁶⁾, särskilt artiklarna 3 och 6 i denna.

Smörolja skall vara försett med ett spårämne och den spårämnesförsedda smöroljan skall kontrolleras i enlighet med kommissionens förordning (EEG) nr 429/90 ⁽⁷⁾, senast ändrad genom förordning (EEG) nr 1264/92, särskilt artiklarna 10 och 11 i denna.

För att förebygga risken att subventionerat smör används på otillåtet sätt är det viktigt att villkoren avseende tillsats av spårämne till smörolja uppfylls till fullo.

Med hänsyn till att tillsats av spårämnen spelar en viktig roll inom dessa stödsystem, är det nödvändigt att fastställa gemensamma metoder för påvisning av alla de spårämnen som krävs enligt dessa system, vilka metoder skall tillämpas på samma sätt inom hela gemenskapen. Detta skulle bland annat säkerställa lika behandling av samtliga aktörer som kan utnyttja dessa system samt undanröja ojämlika konkurrensvillkor som för närvarande kan förekomma till följd av att olika nationella analysmetoder tillämpas.

Det är svårt att fastställa sådana referensmetoder för samtliga spårämnen samtidigt. Fastställandet av en referensmetod för påvisning av stigmasterol och sitosterol i smörolja utgör ett första steg i denna riktning.

De åtgärder som föreskrivs i denna förordning är förenliga med yttrandet från Förvaltningskommittén för mjölk och mjölkprodukter.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

⁽¹⁾ EGT nr L 148, 28.6.1968, s. 13.

⁽²⁾ EGT nr L 215, 30.7.1992, s. 64.

⁽³⁾ EGT nr L 298, 12.11.1985, s. 9.

⁽⁴⁾ EGT nr L 135, 19.5.1992, s. 5.

⁽⁵⁾ EGT nr L 55, 1.3.1988, s. 31.

⁽⁶⁾ EGT nr L 14, 21.1.1992, s. 28.

⁽⁷⁾ EGT nr L 45, 21.2.1990, s. 8.

▼B*Artikel 1***▼M1**

Den referensmetod för analys som anges i bilagan skall tillämpas för bestämning av innehållet av stigmasterol i smörolja i enlighet med artikel 6 i förordning (EEG) nr 3143/85, artikel 6 i ►**M2** förordning (EG) nr 2571/97 ◀ eller artikel 11 i förordning (EEG) nr 429/90, och för bestämning av innehållet av β -sitosterolhalten i smörolja i enlighet med artikel 6 i ►**M2** förordning (EG) nr 2571/97 ◀.

▼B

Smörolja har tillsatts spårämnen på korrekt sätt om de erhållna resultaten överensstämmer med de krav som anges i punkt 8 i bilagan till denna förordning.

Artikel 2

Denna förordning träder i kraft den tredje dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska gemenskapernas officiella tidning*.

Den skall tillämpas från och med den 1 februari 1993.

Denna förordning är till alla delar bindande och direkt tillämplig i alla medlemsstater.



BILAGA

BESTÄMNING AV SITOSTEROL ELLER STIGMASTEROL I SMÖROLJA GENOM GASKROMATOGRAFI MED KAPILLÄRKOLONN

1. RÄCKVIDD OCH TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Metoden utgörs av ett förfarande för kvantitativ bestämning av sitosterol eller stigmasterol i smörolja. Med sitosterol förstås summan av β -sitosterol och 22-dihydro- β -sitosterol, andra sitosteroler anses vara utan betydelse. Metoden skall tillämpas på prover som tagits i enlighet med förordningarna (EEG) nr 3143/85, (EEG) nr 570/88 och (EEG) nr 429/90.

2. PRINCIP

Smöroljan förtvålvas med kaliumhydroxid i en etanollösning och de icke-förtvålningbara beståndsdelarna extraheras med dietyleter.

Sterolerna omvandlas till trimetylsilyleter och analyseras genom gaskromatografi med en kapillärkolonn med betulin som intern standard.

3. UTRUSTNING

- 3.1. En 150 ml kolv till förtvålning med återloppskylare med inslipade anslutningar.
- 3.2. 500 ml separertratt.
- 3.3. 250 ml kolvar.
- 3.4. Tryckutjämningsrör, 250 ml eller motsvarande, för att samla upp överbliven dietyleter.
- 3.5. Glaskolonn, 350 mm \times 20 mm med sintrad glaspropp.
- 3.6. Vattenbad eller värmemantel.
- 3.7. Reaktionskärl, 2 ml.
- 3.8. Gaskromatograf lämplig för kapillärkolonn med split-injektionssystem, bestående av:
 - 3.8.1. termostatstyrd kolonnugn som kan hålla den önskade temperaturen med en noggrannhet av ± 1 °C.
 - 3.8.2. förångningsenhet med temperaturinställning,
 - 3.8.3. flamjoniseringsdetektor och signalomvandlingsförstärkare,
 - 3.8.4. integrerad skrivare som kan användas tillsammans med signalomvandlingsförstärkaren (3.8.3).
- 3.9. Kapillärkolonn i kvartsglas helt belagd med BP1 eller likvärdigt med en enhetlig tjocklek av 0,25 μ m. Kolonnen skall kunna separera trimetylsilylderivat av lanosterol och sitosterol; en BP 1-kolonn på 12 m med en inre diameter på 0,2 mm är lämplig.
- 3.10. En 1 μ l mikrospruta för gaskromatografi med härdad nål.

4. REAGENSER

Alla reagenser skall vara av för analytiska ändamål godkänd klass. Vattnet skall vara destillerat eller vatten med minst motsvarande renhetsgrad.

- 4.1. Etanol med en lägsta renhetsgrad av 95 %.
- 4.2. Kaliumhydroxid, 60-procentig lösning: lös 600 g kaliumhydroxid (minst 85 %) i vatten och späd med vatten till 1 liter.
- 4.3. Betulin med en lägsta renhetsgrad av 99 %.
 - 4.3.1. Intern standardlösning. Betulin i dietyleter (4.4).
 - 4.3.1.1. Betulinlösning som används vid bestämning av sitosterol skall ha koncentrationen 1,0 mg/ml.
 - 4.3.1.2. Betulinlösning som används vid bestämning av stigmasterol skall ha koncentrationen 0,4 mg/ml.

▼B

- 4.4. Analytiskt ren dietyleter (fri från peroxider och återstod).
- 4.5. Natriumsulfat, vattenfritt granulat som torkats vid 102 °C i två timmar.
- 4.6. Silyleringsreagens, t. ex. TRI-SIL (kan beställas från Pierce Chemical Co., katalognr: 49001) eller motsvarande. (VARNING: TRI-SIL är lättantändligt, frätande, giftigt och möjligen cancerogent. Laboratoriepersonal skall ha kännedom om säkerhetsbestämmelserna för TRI-SIL och vidta lämpliga försiktighetsåtgärder.)
- 4.7. Lanosterol.
- 4.8. Sitosterol, med en fastställd lägsta renhetsgrad av 90 % (P).

Anmärkning 1: Renhetsgraden hos standardämnen som används för kalibrering skall bestämmas med tillämpning av standardiseringsprincipen. Antag att alla steroler som finns i provet finns representerade på kromatogrammet, att topparnas totala area representerar 100 % av sterolbeståndsdelarna och att sterolerna ger samma detektorrespons. Systemets linjäritet skall kontrolleras för de aktuella koncentrationsområdena.

- 4.8.1. Standardlösning av sitosterol - bered en lösning som med 0,001 mg/ml noggrannhet innehåller ca 0,5 mg/ml (W_1) sitosterol (4.8) i dietyleter (4.4).
- 4.9. Stigmasterol med en fastställd lägsta renhetsgrad av 90 % (P).
- 4.9.1. Standardlösning av stigmasterol — bered en lösning som med 0,001 mg/ml noggrannhet innehåller ca 0,2 mg/ml (W_1) stigmasterol (4.9) i dietyleter (4.4).
- 4.10. Lösning för kontroll av separationsförmågan. Bered en lösning som innehåller 0,05 mg/ml lanosterol (4.7) och 0,5 mg/ml sitosterol (4.8) i dietyleter (4.4).

5. FÖRFARANDE

- 5.1. Beredning av standardlösningar för kromatografi. Den interna standardlösningen (4.3.1) skall tillsättas den aktuella sterolstandardlösningen samtidigt som den tillsätts det förtvålade provet (se 5.2.2).
 - 5.1.1. Standardkromatografilösning för sitosterol: överför 1 ml sitosterolstandardlösning (4.8.1) till vart och ett av de två reaktionskärlen (3.7) och avlägsna dietyleter med kväve. Tillsätt 1 ml intern standardlösning (4.3.1.1) och avlägsna dietyleter med kväve.
 - 5.1.2. Standardkromatografilösning för sitosterol: överför 1 ml stigmasterolstandardlösning (4.9.1) till vart och ett av de två reaktionskärlen (3.7) och avlägsna dietyleter med kväve. Tillsätt 1 ml intern standardlösning (4.3.1.2) och avlägsna dietyleter med kväve.
- 5.2. Beredning av icke-förtvålbara beståndsdelar
 - 5.2.1. Väg med 1 mg noggrannhet upp ca 1 g smörolja (W_2) i en 150 ml kolv (3.1). Tillsätt 50 ml etanol (4.1) och 10 ml kaliumhydroxidlösning (4.2). Montera återloppskylaren och värm till ca 75 °C i 30 minuter. Avlägsna kylaren och kyl kolven till rumstemperatur.
 - 5.2.2. Tillsätt 1,0 ml intern standardlösning (4.3.1.1) i kolven om det är sitosterol som skall bestämmas, eller (4.3.1.2) om det är stigmasterol som skall bestämmas. Blanda väl. Överför kolvens innehåll kvantitativt till en 500 ml separertratt (3.2) och skölj kolven med 50 ml vatten och 250 ml dietyleter (4.4). Skaka separertratten kraftigt i två minuter och låt faserna separera. Den nedre vattenhaltiga fasen tappas av och eterfasen tvättas genom att separertratten skakas fyra gånger med 100 ml vatten vardera.

Anmärkning 2: För att undvika att en emulsion bildas, är det viktigt att de två första vattentvättningarna utförs försiktigt (tratten vänds tio gånger). Vid tredje tvättningen kan tratten skakas kraftigt i 30 sekunder. Om en emulsion bildas, kan den brytas ned genom tillsats av 5-10 ml etanol. Om etanol tillsätts, är det viktigt att utföra ytterligare två grundliga tvättningar med vatten.
 - 5.2.3. Den klara, tvålfria eterfasen får passera en glaskolonn (3.5) som innehåller 30 g vattenfritt natriumsulfat (4.5). Etern uppsamlas i en 250 ml kolv (3.3). Tillsätt en koksten och förånga etern nästan helt i vattenbad eller värmeisolerande mantel och samla noggrant upp resterande lösningsmedel.

Anmärkning 3: Om provextrakt förångas fullständigt vid för hög temperatur kan sterolförlust förekomma.

▼B

5.3. Beredning av trimetylsilyleterar

5.3.1. Överför den resterande eterlösningen i kolven till ett 2 ml reaktionskärl (3.7) med 2 ml dietyleter och avlägsna etern med en kväveström. Skölj kolven ytterligare två gånger med 2 ml dietyleter. Innehållet överförs varje gång till reaktionskärlet och etern förångas med kväve.

5.3.2. Provet silyleras genom tillsats av 1 ml TRI-SIL (4.6). Förslut kärlet och skaka kraftigt så att provet löses. Om det inte löses fullständigt genom skakning, värm till 65-70 °C. Låt stå i minst fem minuter innan det sprutas in i gaskromatografen. Silylera standardlösningarna på samma sätt som provet. Silylera lösningen för kontroll av separationsförmågan (4.10) på samma sätt som proven.

Anmärkning 4: Silylering skall ske i vattenfri miljö. Ofullständig silylering av betulin indikeras av en andra topp intill betulinets topp. Förekomst av etanol kommer att påverka silyleringen. Om tvättningen i extraktionsskedet är otillräcklig kan detta problem uppstå. Om problemet kvarstår kan en femte tvättning göras under extraktionen varvid reaktionskärlet skakas kraftigt i 30 sekunder.

5.4. Gaskromatografisk analys

5.4.1. Kromatografiförhållanden

Förbered gaskromatografen enligt bruksanvisningen.

Riktlinjerna för kromatografins utförande är följande:

— kolonntemperatur	265 °C
— insprutningstemperatur	280 °C
— detektortemperatur	300 °C
— bärargasens flödes hastighet	0,6 ml/minut
— vättets tryck	84 kPa
— lufttryck	155 kPa

— splitsystemet ställs in på mellan 10:1 och 50:1 och optimeras i enlighet med bruksanvisningen, varefter detektorresponsens linjäritet kontrolleras inom de aktuella koncentrationsområdena.

Anmärkning 5: Det är särskilt viktigt att injektionssystemets linerinsats rengörs regelbundet. Insprutad mängd: 1 µl trimetylsilyleterlösning.

Systemet skall vara i jämvikt och responsen stabil innan analysen påbörjas.

Dessa förhållanden kan varieras om särskilda egenskaper hos kolonnen och gaskromatografen gör det nödvändigt för att erhålla kromatogram som uppfyller följande krav:

— Sitosteroltoppen skall vara tydligt skild från lanosteroltoppen. Figur 1 visar hur ett typiskt kromatogram av en silylerad lösning för kontroll av separationsförmågan (4.10) skall se ut.

— Den relativa retentionstiden för följande steroler bör vara ungefär

kolesterol	1,0,
stigmasterol	1,3,
sitosterol	1,5,
betulin	2,5.

— Retentionstiden för betulin bör vara ungefär 24 minuter.

5.4.2. Analysförfarande

Spruta in 1 µl silylerad standardlösning (stigmasterol eller sitosterol) och justera integratorns kalibreringsparametrar.

Spruta in ytterligare 1 µl silylerad standardlösning för bestämning av responsfaktorerna för betulin.

Spruta in 1 µl silylerad provlösning och mät topparnas areor. Varje kromatografisk serie skall inledas och avslutas med insprutning av standardlösningar.

Som regel bör en standardlösning insprutas efter varje serie om sex insprutningar av provlösning.

Anmärkning 6: Integrering av stigmasteroltoppen bör inbegripa eventuell svansning enligt definition i punkterna 1, 2 och 3 i figur 2b. Integrering av sitosteroltoppen bör inbegripa toppen för 22-

▼B

dihydro- β -sitosterol (stigmastanol) som eluerar omedelbart efter sitosterol, se figur 3b, när den totala kvantiteten sitosterol bestäms.

6. BERÄKNING AV RESULTAT

- 6.1. Bestäm arean för steroltopparna och betulintopparna i båda referenskromatogrammen kring en serie och beräkna R_1 på följande sätt:

$$R_1 = \frac{\text{Genomsnittlig toppareal för sterol i standardlösning}}{\text{Genomsnittlig toppareal för betulin i standardlösning}}$$

Bestäm arealen för steroltoppen (stigmasterol eller sitosterol) och betulintoppen i provet och beräkna R_2 på följande sätt:

$$R_2 = \frac{\text{Toppareal för sterol i provet}}{\text{Toppareal för betulin i provet}}$$

W_1 = Mängden sterol (mg) i 1 ml standardlösning (4.8.1 eller 4.9.1).

W_2 = Provets vikt (5.2.1).

P = Standardsterolens renhetsgrad (4.8 eller 4.9).

$$\text{Mängden sterol i provet mg/kg} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10.$$

7. METODENS NOGGRANNHET

7.1. Repeterbarhet

7.1.1. Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som inom kortast möjliga tidsintervall utförts av samma kemist med användning av samma utrustning på identiskt lika prover får inte överstiga 10,2 mg/kg.

7.1.2. Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som inom kortast möjliga tidsintervall utförts av samma kemist med användning av samma utrustning på identiskt lika prover får inte överstiga 3,6 % av genomsnittet av resultaten.

7.2. Reproducerbarhet

7.2.1. Stigmasterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som utförts av olika kemister i olika laboratorier med användning av olika utrustningar på identiskt lika prover får inte överstiga 25,3 mg/kg.

7.2.2. Sitosterol

Skillnaden mellan resultaten av två analyser som utförts av olika kemister i olika laboratorier med användning av olika utrustningar på identiskt lika prover får inte överstiga 8,9 % av genomsnittet av resultaten.

7.3. Källa till precisionsdata

Precisionsdata bestämdes genom ett experiment som utfördes 1991 i nio olika laboratorier och med sex prover (tre dubbla blindtester) för stigmasterol, sex prover (tre dubbla blindtester) för sitosterol.

8. TOLERANSGRÄNSER

▼M2

- 8.1. Tre prover skall tas från den spårade produkten för att kontrollera att produkten har spårats på rätt sätt.

▼B

8.2. Stigmasterol

- 8.2.1. 150 g stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 % iblandas per ton smörolja, dvs. 142,5 mg/kg, eller 170 g stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 % per ton smörolja, dvs. 144,5 mg/kg.

▼M2 8.2.2 Analysresultaten av de tre produktproverna skall användas för att kontrollera renhetsgraden och homogeniteten av spårämnets iblandning och det lägsta resultatet skall jämföras med följande gränser (med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % (CrD95)):

- 120,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %).
- 122,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 %).
- 84,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 95 %).
- 86,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen för stigmasterol med en lägsta renhetsgrad av 85 %).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan antingen 120,0 mg/kg och 84,0 mg/kg eller 122,0 mg/kg och 86,0 mg/kg.

▼B 8.3. Sitosterol

8.3.1. 600 g sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 % iblandas per ton smörolja, dvs. 540 mg/kg.

▼M2 8.3.2 Analysresultaten av de tre produktproverna skall användas för att kontrollera renhetsgraden och homogeniteten av spårämnets iblandning och det lägsta resultatet skall jämföras med följande gränser (med ett konventionellt konfidensintervall på 95 % (CrD95)):

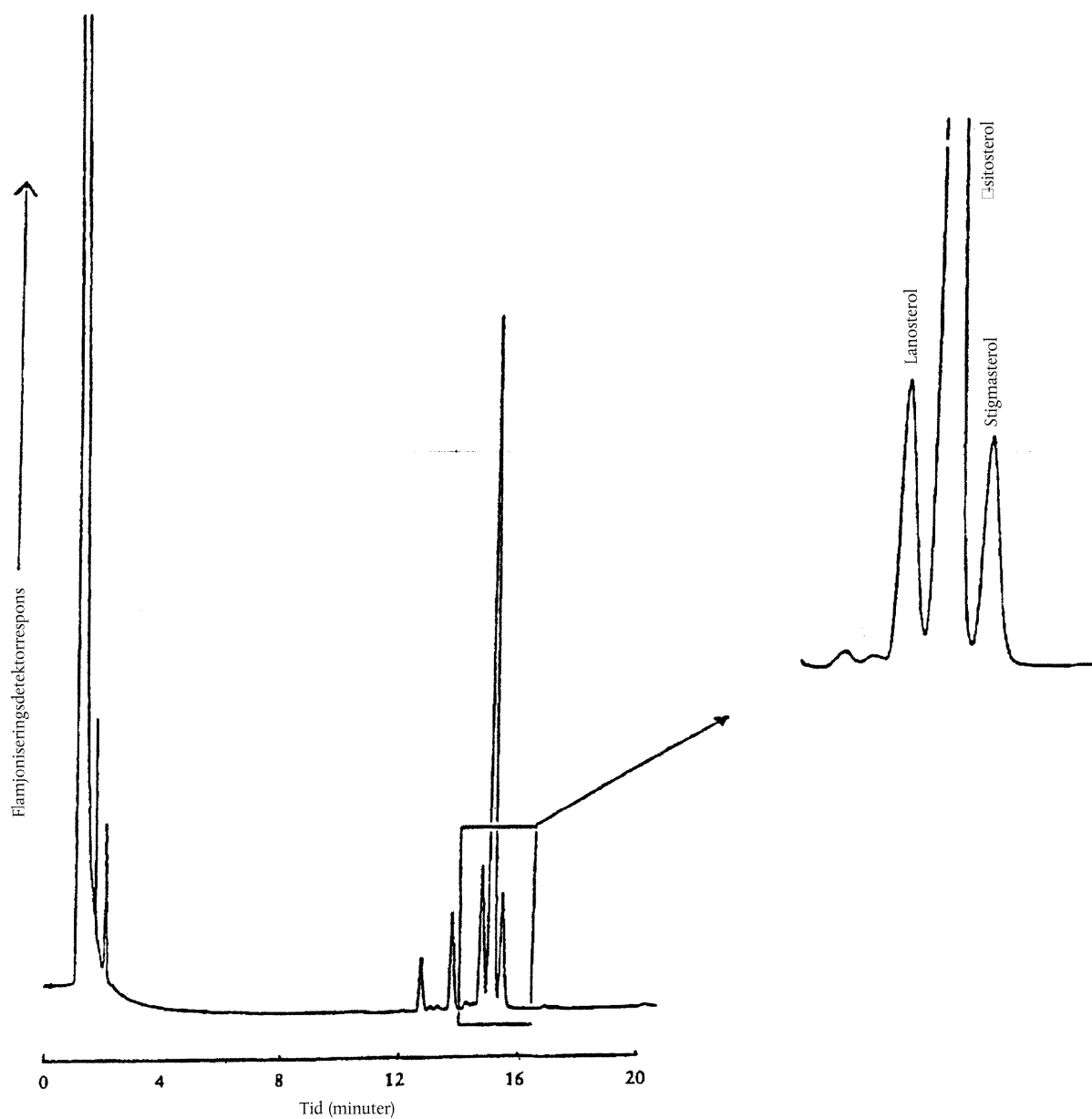
- 486,0 mg/kg (95 % av den minsta tillåtna iblandningen för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 %).
- 358,0 mg/kg (70 % av den minsta tillåtna iblandningen för sitosterol med en lägsta renhetsgrad av 90 %).

Koncentrationen av spårämne i det prov som ger det lägsta resultatet jämförs med en interpolering mellan 486,0 mg/kg och 358,0 mg/kg.

▼B

Figur 1 Kromatogram av lösning för kontroll av separationsförmåga,

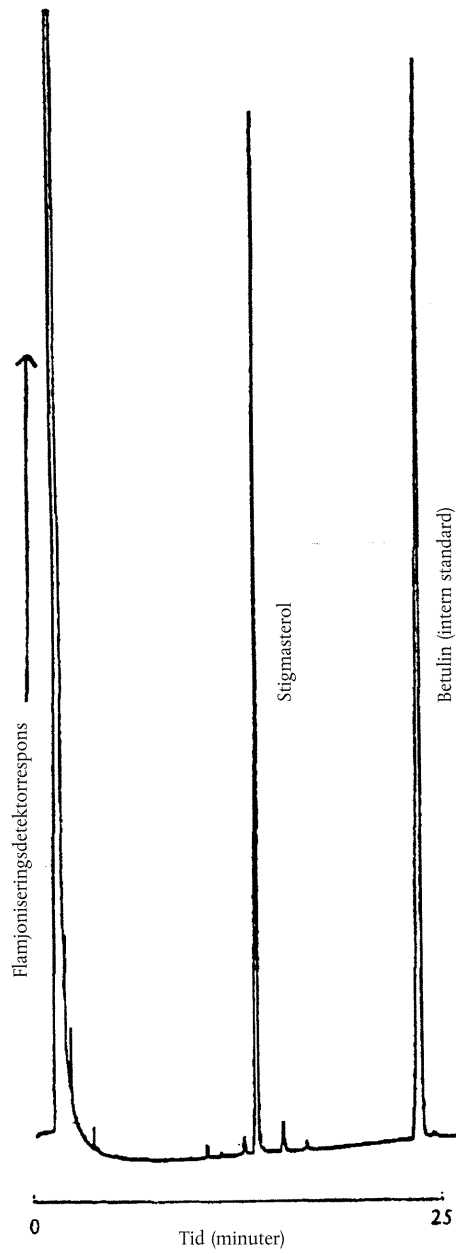
Det bästa är om topparna är helt åtskilda, dvs. att linjen för lanosteroltoppen går ner till baslinjen innan den går upp till sitosteroltoppen. En viss överlappning kan tolereras.



▼B

Figur 2a

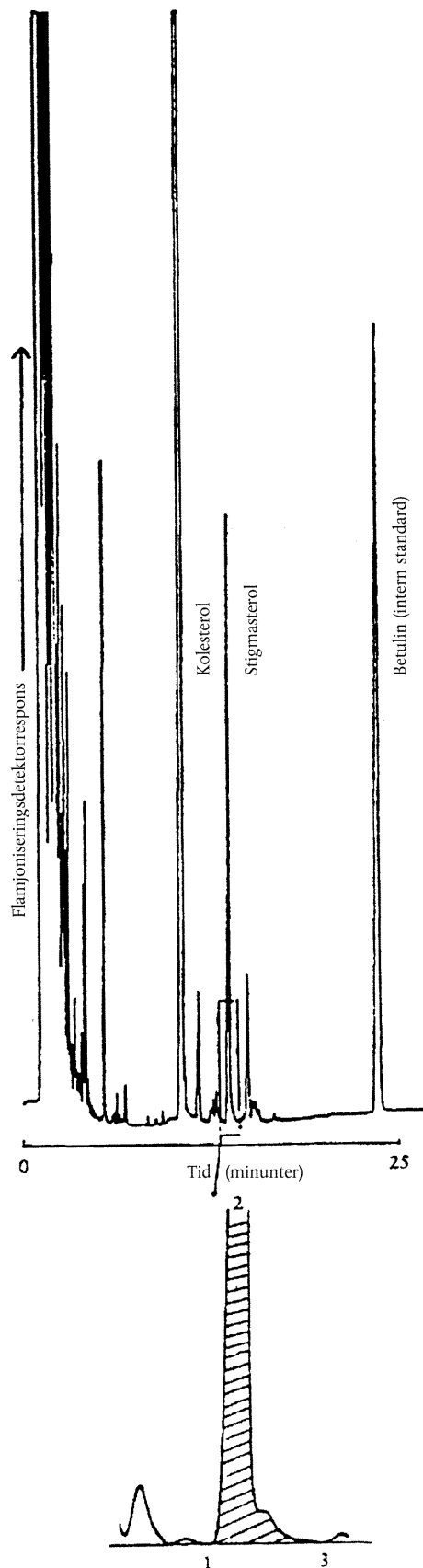
Standardstigmasterol



▼B

Figur 2b

Smöroljeprov denaturerat med stigmasterol

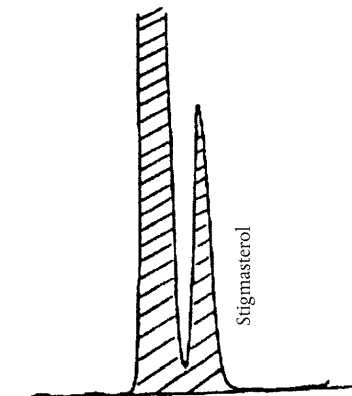
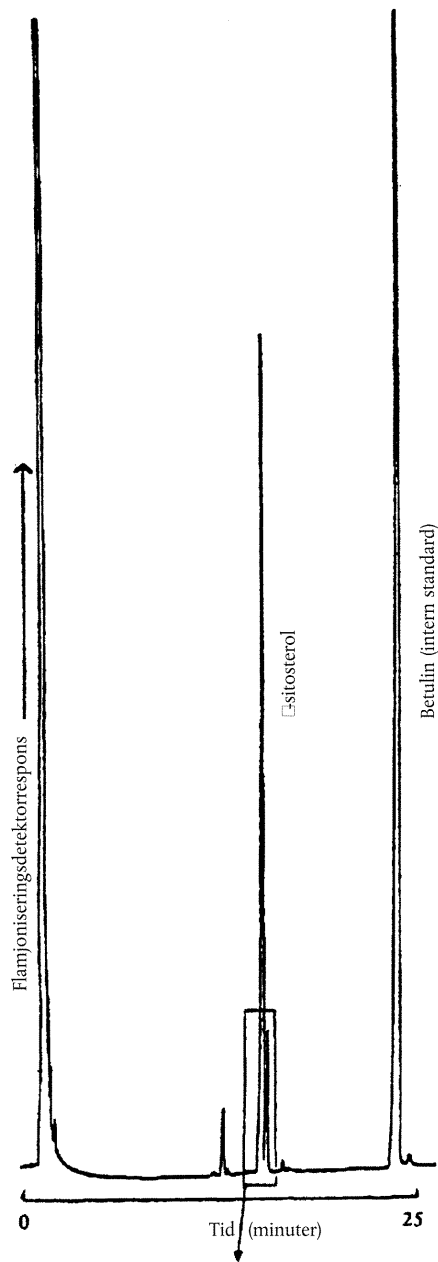


Anmärkning: Integrering av stigmasteroltoppen bör inbegripa eventuell svansning som av gränssas av punkt 1, 2 och 3.

▼B

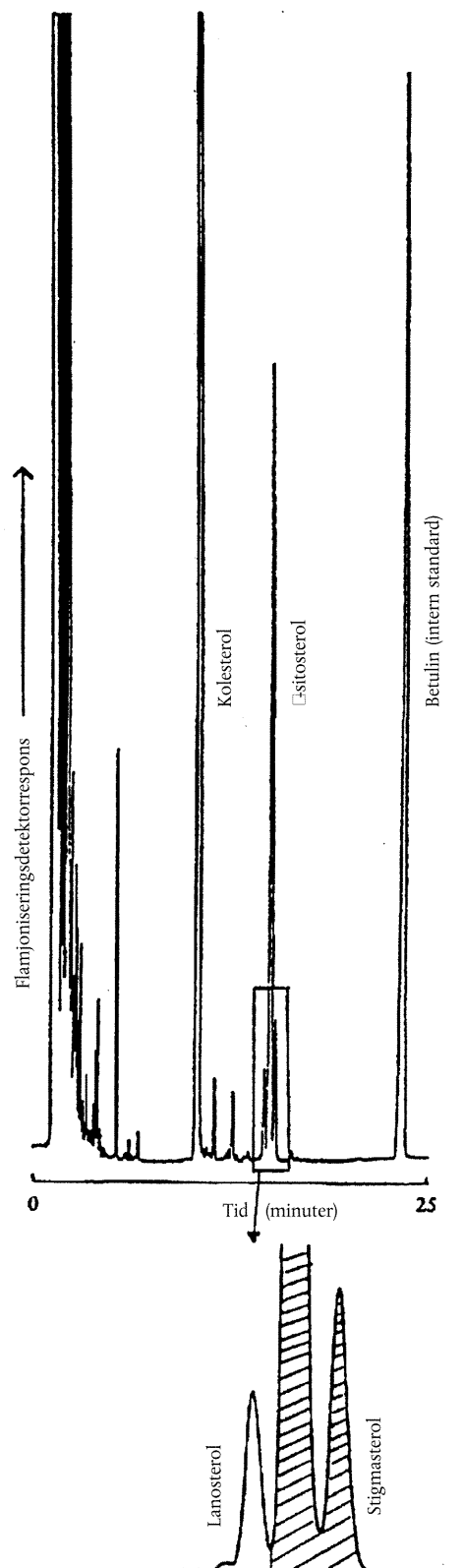
Figur 3a

Standardsitosterol



▼B

Figur 3b

Smöroljeprov denaturerat med β -sitosterol

Anmärkning: β -sisterol innehåller ofta en orenhet (identifierad som stigmasterol) som cluerar onmedelbart efter β -sitosterol. Dessa två toppars arealer bör adderas vid bestämning av det totala innehållet av β -sitosterol.