RÈGLEMENT (CE) N° 86/94 DE LA COMMISSION

du 19 janvier 1994

établissant une méthode de référence pour la détermination du sitostérol et du stigmastérol dans le beurre

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu le règlement (CEE) n° 804/68 du Conseil, du 27 juin 1968, portant organisation commune des marchés dans le secteur du lait et des produits laitiers (1), modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2071/92 (2), et notamment son article 6 paragraphe 7,

considérant que le beurre peut être marqué et que les produits marqués doivent être contrôlés en vertu des articles 3 et 6 du règlement (CEE) n° 570/88 de la Commission (3), modifiée en dernier lieu par le règlement (CE) n° 3049/93 (4);

considérant que le strict respect des conditions relatives au marquage du beurre est indispensable pour prévenir tout risque d'utilisation illicite du beurre subventionné ;

considérant que, compte tenu de l'importance du marquage dans le bon fonctionnement de ces systèmes, il convient de définir des méthodes communes de détection de tous les marqueurs exigés dans le cadre de ces systèmes ; que cela permettrait notamment d'assurer une égalité de traitement entre tous les opérateurs utilisant ces systèmes et d'éliminer toute inégalité dans les conditions de concurrence pouvant actuellement résulter des différences dans les méthodes d'analyse nationales ;

considérant que le règlement (CEE) n° 3942/92 de la Commission (5) définit une méthode de référence pour la détermination du sitostérol et du stigmastérol dans le *butter oil;* que cette méthode peut être appliquée sous une forme légèrement modifiée pour déterminer les marqueurs stérol dans le beurre ;

considérant qu'il convient de définir la précision de la méthode et ses limites de tolérance ;

considérant que les mesures prévues dans le présent règlement sont conformes à l'avis du comité de gestion du lait et des produits laitiers,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT :

Article premier

La méthode d'analyse de référence à appliquer pour la détermination de la teneur du beurre en stigmastérol ou en β-sitostérol conformément à l'article 6 du règlement (CEE) n° 570/88 figure en annexe.

Le beurre a été marqué correctement si les résultats obtenus satisfont aux conditions précisées au point 8 de l'annexe.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes.*

Il est applicalbe à partir du 1er avril 1994.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 19 janvier 1994.

Par la Commission

René STEICHEN

Membre de la Commission

(1) JO n° L 148 du 28. 6. 1968, p. 13.
(2) JO n° L 215 du 30. 7. 1992, p. 64.
(3) JO n° L 55 du 1. 3. 1988, p. 31.
(4) JO n° L 273 du 5. 11. 1993, p. 7.
(5) JO n° L 399 du 31. 12. 1992, p. 29.

ANNEXE

DÉTERMINATION DU SITOSTÉROL OU DU STIGMASTÉROL DANS LE BEURRE PAR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE AVEC COLONNE CAPILLAIRE

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode décrit une procédure permettant la détermination quantitative du sitostérol ou du stigmastérol dans le beurre. Le sitostérol est la somme du β-sitostérol et du 22-dihydro-β-sitostérol, les autres sitostérols étant considérés comme peu importants. Cette méthode s'applique aux échantillons obtenus dans le cadre du règlement (CEE) n° 570/88.

2. PRINCIPE

Le beurre est saponifié à l'aide d'hydroxyde de potassium dans une solution d'éthanol et les insaponifiables sont extraits à l'aide d'éther.

Les stérols sont transformés en triméthyl-silyl-éthers et sont analysés par chromatographie en phase gazeuse avec colonne capillaire par rapport à un étalon interne : la bétuline.

3. APPAREILLAGE

3.1. Ballon de saponification de 150 ml équipé d'un réfrigérant à reflux à embouts rodés.

3.2. Ampoules à décanter de 500 ml.

3.3. Ballons de 250 ml.

3.4. Ampoules d'égalisation de la pression, de 250 ml ou d'une contenance similaire, destinées à recueillir l'éther à jeter.

3.5. Colonne de verre, de 350 mm × 20 mm, dotée d'un raccord en verre fritté.

3.6. Bain-marie ou manchon isotherme.

3.7. Flacons à réaction, de 2 ml.

3.8. Appareil de chromatographie en phase gazeuse pouvant être utilisé avec une colonne capillaire, muni d'un dispositif de fonctionnement composé :

3.8.1. d'un four thermostaté pour les colonnes pouvant maintenir la température souhaitée avec une précision de ± 1 °C ;

3.8.2. d'un injecteur thermoréglable ;

3.8.3. d'un détecteur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur ;

3.8.4. d'un intégrateur-enregistreur pouvant être utilisé avec le convertisseur-amplificateur (3.8.3).

3.9. Colonne capillaire en verre de silice entièrement recouverte de BP 1 ou d'une substance équivalente d'une épaisseur uniforme de 0,25 µm ; la colonne doit être en mesure de résoudre les dérivés triméthyl-silyl du lanostérol et du sitostérol. Une colonne BP 1 de 12 m de longueur et de diamètre interne de 0,2 mm est appropriée.

3.10. Microseringue à aiguille en acier trempé pour chromatographie en phase gazeuse de 1µl.

4. RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau d'une pureté au moins équivalente.

4.1. Éthanol, pur au moins à 95 %.

4.2. Hydroxyde de potassium, solution à 60 %, dissoudre 600 g d'hydroxyde de potassium (minimum 85 %) dans de l'eau et compléter à 1 l avec de l'eau.

4.3. Bétuline d'une pureté d'au moins 99 %.

4.3.1. Solutions de bétuline dans l'éther diéthylique (4.4).

4.3.1.1. La concentration de la solution de bétuline utilisée pour la détermination du sitostérol doit être de 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. La concentration de la solution de bétuline utilisée pour la détermination du stigmastérol doit être de 0,4 mg/ml.

4.4. Éther diéthylique, de pureté analytique (exempt de péroxydes ou de résidus).

4.5. Sulfate de sodium, anhydre, en granulés, préalablement séché à 102 °C pendant 2 heures.

4.6. Réactif de silylation, par exemple, TRI-SIL (pouvant être obtenu auprès de Pierce Chemical Co., Cat n° 49001) ou équivalent. (ATTENTION : le TRI-SIL est inflammable et toxique, corrosif et peut être carcinogène. Le personnel de laboratoire doit bien connaître les règles de sécurité applicables au TRI-SIL et prendre les précautions qui s'imposent).

4.7. Lanostérol.

4.8. Sitostérol, de pureté connue, égale ou supérieure à 90 % (P).

Note 1 : La pureté des matériaux étalons utilisés pour le calibrage doit être déterminée à l'aide de la méthode de normalisation. On part de l'hypothèse que tous les stérols présents dans l'échantillon sont représentés dans le chromatogramme, que la surface totale des pics représente 100 % des constituants stéroliques et que les stérols donnent la même réponse au détecteur. La linéarité du système doit être vérifiée pour les niveaux de concentrations considérés.

4.8.1. Solution étalon de sitostérol : préparer une solution à 0,001 mg/ml près, contenant environ 0,5 mg/ml (W_1) de sitostérol (4.8) dans de l'éther diéthylique (4.4).

4.9. Stigmastérol, d'une pureté connue, égale ou supérieure à 90 % (P).

4.9.1. Solution étalon de stigmastérol : préparer une solution à 0,001 mg/ml près, contenant environ 0,2 mg/ml (W_1) de stigmastérol (4.9) dans de l'éther diéthylique (4.4).

4.10. Mélange pour le test de résolution : préparer une solution contenant 0,05 mg/ml de lanostérol (4.7) et 0,5 mg/ml de sitostérol (4.8) dans de l'éther diéthylique (4.4).

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. Préparation des solutions étalons pour la chromatographie : ajouter la solution étalon interne (4.3.1) à la solution étalon de stérol appropriée en même temps qu'à l'échantillon saponifié (5.2.2).

5.1.1. Solution chromatographique étalon de sitostérol : transférer 1 ml de solution étalon de sitostérol (4.8.1) dans chacun des deux flacons à réaction (3.7) et éliminer l'éther sous un flux d'azote. Ajouter 1 ml de solution étalon interne (4.3.1.1) et éliminer l'éther sous un flux d'azote.

5.1.2. Solution chromatographique étalon de stigmastérol : transférer 1 ml de solution étalon de stigmastérol (4.9.1) dans chacun des deux flacons à réaction (3.7) et éliminer l'éther sous un flux d'azote. Ajouter 1 ml de solution étalon interne (4.3.1.2) et éliminer l'éther sous un flux d'azote.

5.2. Préparation des insaponifiables.

5.2.1. Faire fondre l'échantillon de beurre à une température de 35 °C au maximum ; le mélanger soigneusement en le remuant.

Peser à 1 mg près, environ 1 g de beurre (W_2) dans un flacon de 150 ml (3.1). Ajouter 50 ml d'éthanol (4.1) et 10 ml de solution d'hydroxyde de potassium (4.2). Adapter le réfrigérant à reflux et porter à environ 75 °C pendant 30 minutes. Détacher le réfrigérant et laisser refroidir le ballon à la température ambiante.

5.2.2. Ajouter 1,0 ml de solution étalon interne dans le ballon (4.3.1.1 s'il s'agit de déterminer le sitostérol ou 4.3.1.2 s'il s'agit de déterminer le stigmastérol). Mélanger soigneusement. Transférer le contenu du ballon quantitativement dans une ampoule à décanter de 500 ml (3.2). Rincer le ballon avec 50 ml d'eau, puis 250 ml d'éther diéthylique (4.4). Agiter vigoureusement l'ampoule à décanter pendant 2 minutes et laisser les phases se séparer. Éliminer la phase aqueuse inférieure et laver la phase éthérée en agitant avec 4 parties aliquotes successives de 100 ml d'eau.

Note 2 : Pour éviter la formation d'une émulsion, il est indispensable que les deux premiers rinçages à l'eau soient effectués délicatement (10 inversions). Pour le troisième rinçage, on peut agiter vigoureusement pendant 30 secondes. Si une émulsion se forme, elle peut être éliminée par l'addition de 5 à 10 ml d'éthanol. Si de l'éthanol est ajouté, il est indispensable de procéder à deux nouveaux et vigoureux lavages à l'eau.

5.2.3. Faire passer la phase éthérée limpide et exempte de savon sur une colonne en verre (3.5) contenant 30 g de sulfate de sodium anhydre (4.5). Collecter l'éther dans un ballon de 250 ml (3.3). Ajouter des billes antiprojection et évaporer jusqu'à la quasi-dessication dans un bain-marie ou un manchon isotherme en prenant soin de collecter les solvants à éliminer.

Note 3 : Si des extraits d'échantillons sont évaporés à sec à une température trop élevée, il peut y avoir des pertes de stérol.

5.3. Préparation des triméthyl-silyl-éthers.

5.3.1. Transférer la solution d'éther restant dans le ballon dans un flacon à réaction de 2 ml (3.7) à l'aide de 2 ml d'éther et éliminer l'éther sous un flux d'azote. Laver le ballon avec deux parties aliquotes supplémentaires de 2 ml d'éther en transférant dans le flacon et en éliminant l'éther sous azote à chaque fois.

5.3.2. Silyler l'échantillon en ajoutant 1 ml de TRI-SIL (4.6). Fermer le flacon et agiter vigoureusement pour dissoudre. Si la dissolution est incomplète, porter à 65-70 °C. Laisser reposer pendant au moins 5 minutes avant d'injecter dans le chromatographe en phase gazeuse. Silyler les étalons de la même manière que les échantillons. Silyler le mélange pour le test de résolution (4.10) de la même manière que les échantillons.

Note 4 : La silylation doit se faire dans un environnement anhydre. Une silylation incomplète de la bétuline est indiquée par un second pic proche de celui de la bétuline.

La présence d'éthanol lors de la silylation interférera avec la silylation. Ceci peut résulter d'un lavage insuffisant lors de l'extraction. Si ce problème persiste, un cinquième rinçage, avec agitation vigoureuse pendant 30 secondes, peut être introduit à l'étape de l'extraction.

5.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse.

5.4.1. Choix des conditions opératoires.

Programmer le chromatographe en phase gazeuse selon les instructions du fabricant.

Les conditions opératoires indicatives sont les suivantes :

— température de la colonne : 265 °C

— température de l'injecteur : 280 °C

— température du détecteur : 300 °C

— débit du gaz vecteur : 0,6 ml/min.

— pression de l'hydrogène : 84 kPa

— pression de l'air : 155 kPa

— Injection fractionnée : de 10/1 à 50/1 ; le rapport de fuite doit être optimisé en fonction des instructions du fabricant et la linéarité de la réponse du détecteur validée ensuite pour l'étendue des concentrations qui nous intéressent.

Note 5 : Il est particulièrement important que la chambre de vaporisation soit régulièrement nettoyée.

— quantité de substance injectée : 1 µl de solution TMSE.

Laisser le système s'équilibrer jusqu'à l'obtention d'une réponse suffisamment stable avant d'entreprendre toute analyse.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et du chromatographe en phase gazeuse de manière à obtenir des chromatogrammes qui satisfassent aux conditions suivantes :

— le pic du sitostérol doit présenter une résolution suffisante par rapport au lanostérol. La figure 1 présente un chromatogramme typique tel qu'il doit être obtenu à partir d'un mélange silylé du test de résolution (4.10)

— les temps de rétention relatifs des stérols suivants devraient être d'environ :

cholestérol	1,0
stigmastérol	1,3
sitostérol	1,5
bétuline	2,5

— le temps de rétention de la bétuline devrait être d'environ 24 minutes.

5.4.2. Mode opératoire analytique :

Injecter 1 µl de solution étalon silylée (stigmastérol ou sitostérol) et ajuster les paramètres de calibration de l'intégrateur.

Injecter de nouveau 1 µl de solution étalon silylée pour déterminer le coefficient de réponse par rapport à la bétuline.

Injecter 1 µl de solution d'échantillon silylée et mesurer la surface des pics. Chaque série d'échantillons doit être précédée et suivie d'une injection d'étalons.

En règle générale, l'injection d'étalons peut être effectuée après une série de six échantillons.

Note 6 : L'intégration du pic du stigmastérol devrait comporter les traînées indiquées par les points, 1, 2 et 3 de la figure 2b.

L'intégration du pic du sitostérol devrait englober la surface du pic du 22-dihydro-β-sitostérol (stigmastanol) élué immédiatement après le sitostérol, (figure 3b) lors de l'évaluation du sitostérol total.

6. CALCUL DES RÉSULTATS

6.1. Déterminer la surface des pics de stérol et des pics de bétuline dans les deux étalons en début et fin de chaque série et calculer R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{surface moyenne du pic du stérol dans l'étalon}}{\text{surface moyenne du pic de la bétuline dans l'étalon}}$$

Déterminer la surface du pic du stérol (stigmastérol ou sitostérol) et du pic de bétuline dans l'échantillon et calculer R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{surface du pic du stérol dans l'échantillon}}{\text{surface du pic de la bétuline dans l'échantillon}}$$

W_1 = teneur en stérol de l'étalon (mg) contenu dans 1 ml de solution étalon (4.8.1 ou 4.9.1)

W_2 = poids de l'échantillon (g) (5.2.1)

P = pureté du stérol étalon (4.8 ou 4.9)

$$\text{Teneur de l'échantillon en stérol (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10.$$

7. PRÉCISION DE LA MÉTHODE

7.1. Répétabilité

7.1.1. Stigmastérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées dans l'intervalle de temps le plus court possible pour un opérateur utilisant le même appareillage, sur du matériel d'essai identique, ne doit pas dépasser 19,3 mg/kg.

7.1.2. Sitostérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées dans l'intervalle le plus court possible, par un seul opérateur utilisant le même appareillage, sur du matériel d'essai identique ne doit pas dépasser 23,0 mg/kg.

7.2. Reproductibilité

7.2.1. Stigmastérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées par des opérateurs dans des laboratoires différents utilisant des appareillages différents sur du matériel d'essai identique, ne doit pas dépasser 31,9 mg/kg.

7.2.2. Sitostérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées par des opérateurs dans des laboratoires différents utilisant des appareillages différents, sur du matériel d'essai identique, ne doit pas dépasser 8,7 % par rapport à la moyenne des déterminations.

7.3. Source de données de précision

Les données de précision ont été déterminées à partir d'une expérience menée en 1992 dans huit laboratoires et concernant six échantillons (trois en double aveugle) pour le stigmastérol et six échantillons (trois en double aveuble) pour le sitostérol.

8. LIMITES DE TOLÉRANCE

8.1. Pour vérifier l'homogénéité, il faut prélever trois échantillons du produit tracé.

8.2. Stigmastérol

8.2.1. Le taux d'incorporation pour le stigmastérol est de 150 g de stigmastérol, pur au moins à 95 %, par tonne de beurre, c'est-à-dire 142,5 mg/kg ; ou de 170 g de stigmastérol pur au moins à 85 % par tonne de beurre, soit 144,5 mg/kg.

8.2.2. Si l'on prend en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95}), la moyenne des trois résultats ne doit pas être inférieure :

— à 126,0 mg/kg dans le cas d'une incorporation de stigmastérol pur à 95 %,

— 128,0 mg/kg dans le cas d'une incorporation de stigmastérol pur à 85 %.

8.2.3. En plus des critères indiqués ci-dessus, on utilise le résultat le plus bas obtenu à partir de l'analyse du produit pour vérifier l'homogénéité de la distribution du traceur et ce, par une comparaison avec les limites ci-après :

— 116,4 mg/kg (95 % de taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 95 %, la DCr_{95} pour un seul échantillon étant prise en considération),

— 118,3 mg/kg (95 % de taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 85 %, la DCr_{95} pour un seul échantillon étant prise en considération),

— 95,1 mg/kg (80 % de taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 95 %, la DCr_{95} pour un seul échantillon étant prise en considération),

— 96,7 mg/kg (80 % de taux d'incorporation minimal pour du stigmastérol pur à 85 %, la DCr_{95} pour un seul échantillon étant prise en considération).

La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre respectivement 116,4 mg/kg et 95,1 mg/kg ou 118,3 mg/kg et 96,7 mg/kg.

8.3. Sitostérol

8.3.1. Le taux d'incorporation du sitostérol est de 600 g de sitostérol pur à au moins 90 % par tonne de beurre, c'est-à-dire 540 mg/kg.

8.3.2. Si l'on prend en considération la DCr_{95}, la moyenne des trois résultats ne doit pas être inférieure à 514,4 mg/kg.

8.3.3. En plus du critère indiqué ci-dessus, on utilise le résultat le plus faible obtenu à partir de l'analyse du produit pour vérifier l'homogénéité de la distribution du marqueur et ce, par comparaison avec les limites suivantes :

— 485,1 mg/kg (95 % de taux d'incorporation minimal pour du sitostérol pur à 90 %, un seul échantillon de DCr_{95} étant pris en considération),

— 404,1 mg/kg (80 % de taux d'incorporation minimal pour du sitostérol pur à 90 %, la DCr_{95} pour un seul échantillon étant prise en considération).

La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre respectiveent 485,1 mg/kg et 404,1 mg/kg.

Figure 1 Chromatogramme du mélange pour le test de résolution

La résolution complète est préférable, c'est-à-dire que le tracé du pic du lanostérol doit rejoindre la ligne de base avant de remonter pour le pic du sitostérol, quoiqu'une résolution incomplète soit tolérable.

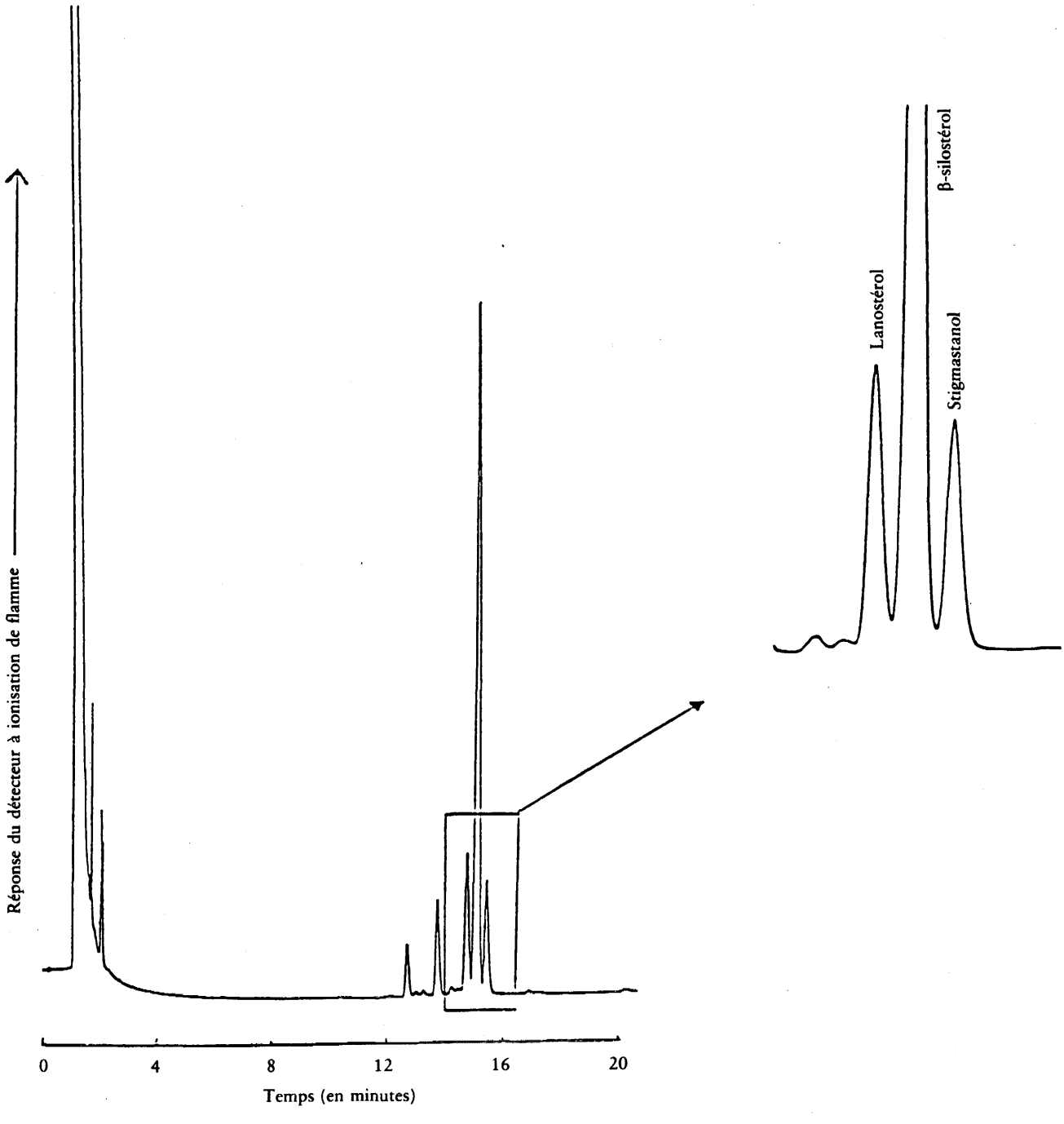


Figure 2a
Stigmastérol étalon

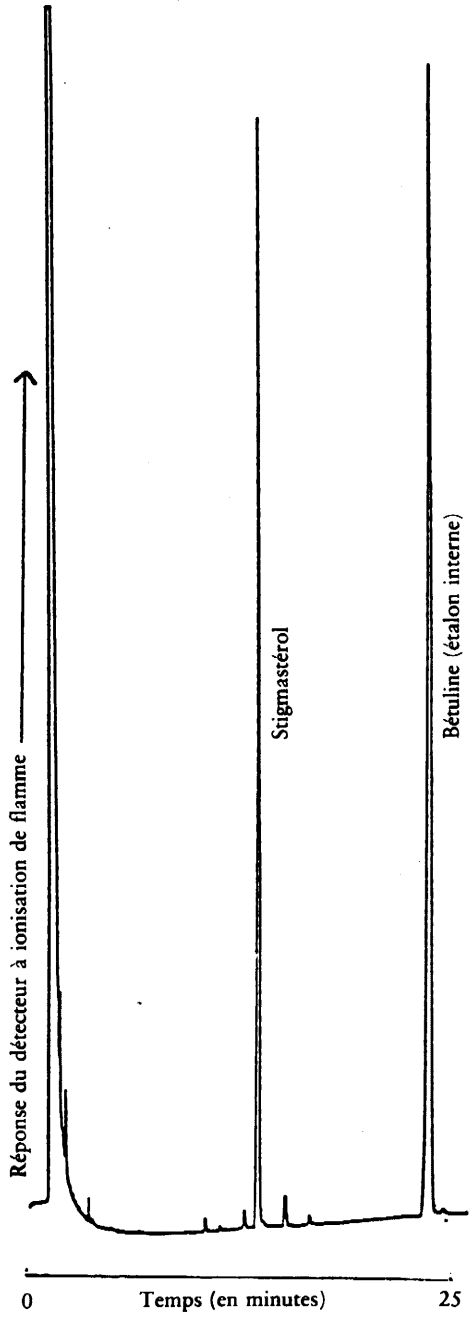
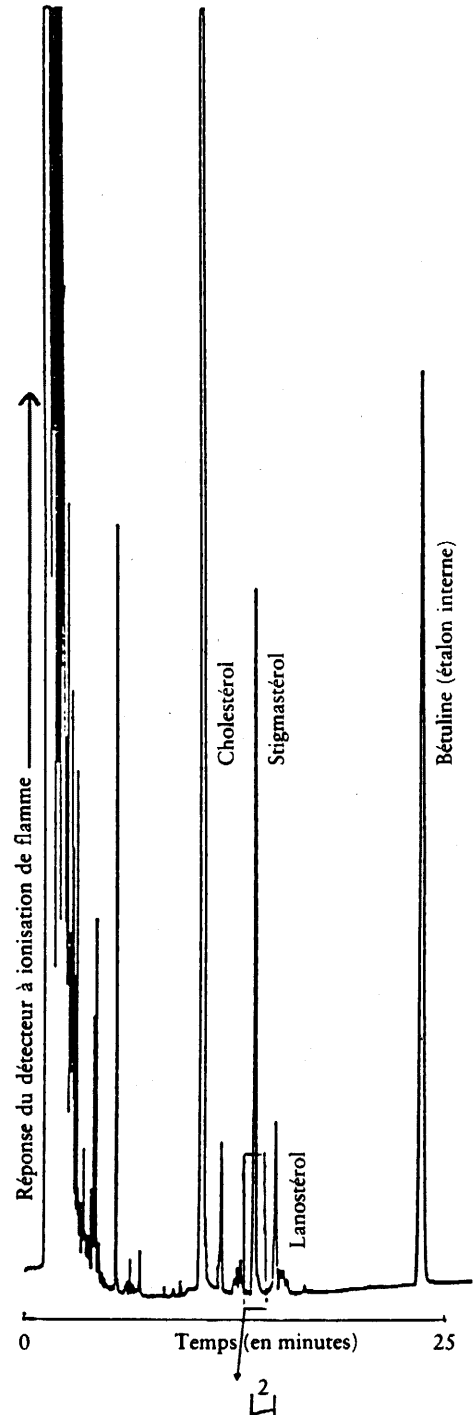
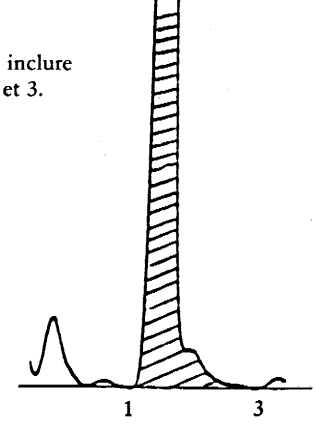


Figure 2b
Échantillon de beurre
dénaturé avec du stigmastérol





Note : L'intégration du pic du stigmastérol devrait inclure toutes les traînées comprises entre les points 1, 2, et 3.

Figure 3a
β-sitostérol étalon

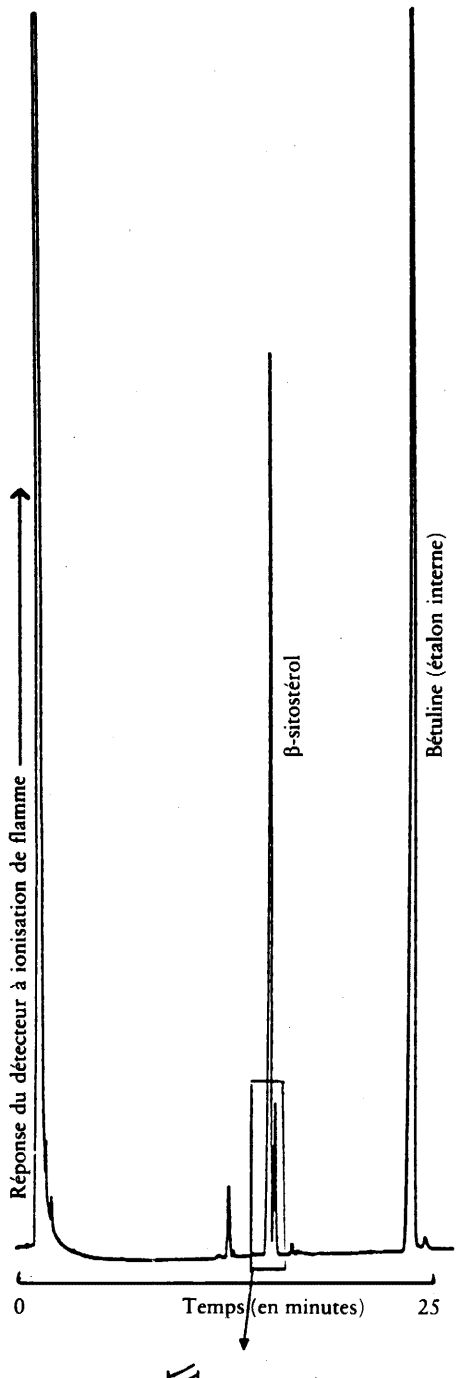
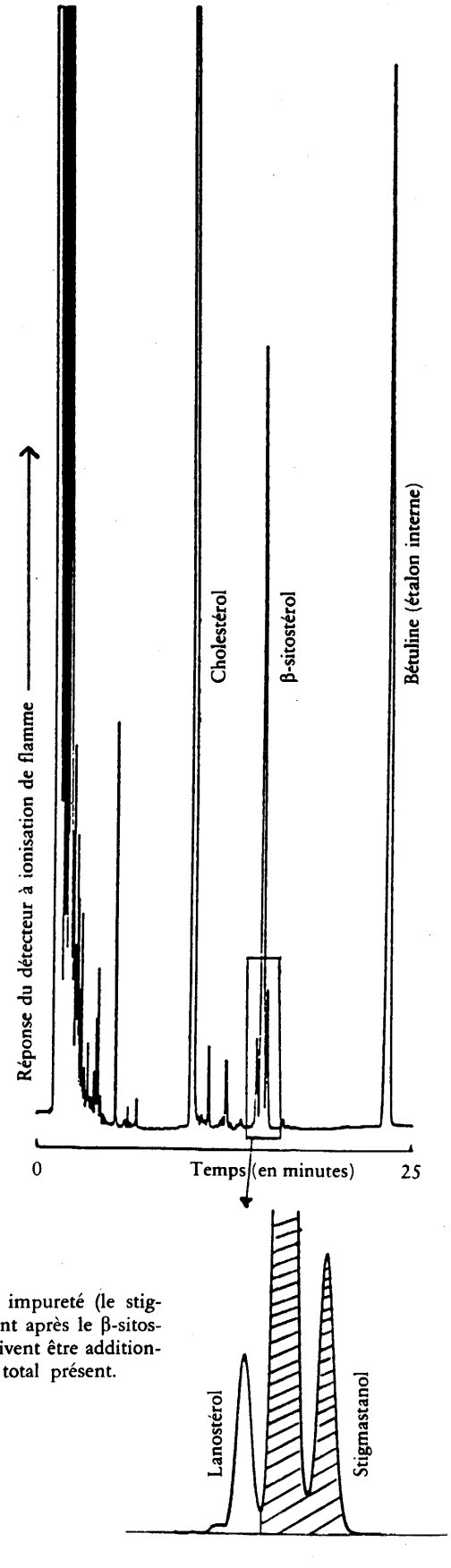


Figure 3b
Échantillon de beurre dénaturé avec du β-sitostérol



Note : Le β-sitostérol contient souvent une impureté (le stigmastanol) qui est éluée immédiatement après le β-sitostérol. Les surfaces de ces deux pics doivent être additionnées lorsqu'on évalue le β-sitostérol total présent.