REGOLAMENTO (CE) N. 86/94 DELLA COMMISSIONE

del 19 gennaio 1994

che fissa un metodo di riferimento per la determinazione del sitosterolo e dello stigmasterolo nel burro

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CEE) n. 804/68 del Consiglio, del 27 giugno 1968, relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore del latte e dei prodotti lattiero-caseari [1], modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 2071/92 [2], in particolare l'articolo 6, paragrafo 7,

considerando che il burro può essere tracciato e che i prodotti tracciati devono essere controllati a norma degli articoli 3 e 6 del regolamento (CEE) n. 570/88 della Commissione [3], modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 3049/93 [4];

considerando che è di importanza fondamentale l'osservanza rigorosa dei requisiti di tracciatura del burro per prevenire il rischio di impieghi non autorizzati del burro sovvenzionato;

considerando che, tenuto conto dell'importanza della tracciatura ai fini del corretto funzionamento del regime in esame, è necessario fissare metodi comuni da applicare in modo uniforme in tutta la Comunità per individuare tutti i traccianti da esso contemplati; che ciò garantirebbe in particolare un uguale trattamento di tutti gli operatori che si avvalgono dei suddetti regimi ed eliminerebbe eventuali disparità di concorrenza connesse attualmente all'applicazione di diversi metodi di analisi nazionali;

considerando che il regolamento (CEE) n. 3942/92 della Commissione [5] ha fissato un metodo di riferimento per la determinazione dello stigmasterolo e del sitosterolo nel butteroil; che lo stesso metodo può essere applicato in una versione leggermente modificata per la detemrinazione degli steroli usati per la tracciatura del burro;

considerando che è necessario determinare la precisione del metodo e i limiti di tolleranza;

considerando che le misure previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per il latte e i prodotti lattiero-caseari,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Il metodo d'analisi di riferimento per la detemrinazione del tenore di stigmasterolo o di β-sitosterolo contenuti nel burro, ai sensi dell'articolo 6 del regolamento (CEE) n. 570/88, è descritto nell'allegato.

Il burro è stato tracciato correttamente se i risultati ottenuti sono conformi ai requisiti di cui al punto 8 dell'allegato.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il terzo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee.*

Esso si applica a decorrere dal 1° aprile 1994.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 19 gennaio 1994.

Per la Commissione

René STEICHEN

Membro della Commissione

---

[1] GU n. L 148 del 28. 6. 1968, pag. 13.
[2] GU n. L 215 del 30. 7. 1992, pag. 64.
[3] GU n. L 55 dell'1. 3. 1988, pag. 31.
[4] GU n. L 273 del 5. 11. 1993, pag. 7.
[5] GU n. L 399 del 31. 12. 1992, pag. 29.

ALLEGATO

DETERMINAZIONE DEL SITOSTEROLO OPPURE DELLO STIGMASTEROLO NEL BURRO MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA CON COLONNA CAPILLARE

1. FINALITÀ E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione quantitativa del sitosterolo o dello stigmasterolo nel burro. Il sitosterolo viene considerato come la somma del β sitosterolo e del 22-diidro-β-sitosterolo, in quanto gli altri sitosteroli vengono considerati irrilevanti. Esso si applica ai campioni ricevuti ai sensi del regolamento (CEE) n. 570/88.

2. PRINCIPIO

Il burro viene saponificato con idrossido di potassio in soluzione etanolica e l'insaponificabile viene estratto con etere etilico.

Gli steroli vengono trasformati in eteri trimetil-sililici ed analizzati mediante gascromatografia su colonna capillare usando come riferimento uno standard interno di betulino.

3. APPRECCHIATURA

3.1. Pallone di saponificazione da 150 ml provvisto di condensatore a ricadere con giunti in vetro smerigliato.

3.2. Imbuti separatori da 500 ml.

3.3. Palloni da 250 ml.

3.4. Imbuti livellatori di pressione, da 250 ml o simili, per la raccolta dell'etere etilico di scarto.

3.5. Colonna di vetro, da 350 mm × 20 mm, provvista di setto in vetro sinterizzato.

3.6. Bagnomaria o cuffia riscaldante.

3.7. Fiale da 2 ml.

3.8. Gascromatografo idoneo ad essere usato con una colonna capillare e provvisto di un sistema di splitting costituito da :

3.8.1. camera termostatica per colonne, capace di mantenere la temperatura desiderata con una precisione di ± 1 °C ;

3.8.2. una camera di vaporizzazione termoregolabile ;

3.8.3. un rivelatore a ionizzazione di fiamma ed un convertitore-amplificatore ;

3.8.4. un integratore-registratore idoneo ad essere usato con il convertitore-amplificatore (3.8.3).

3.9. Una colonna capillare in silice fusa coperta interamente di 100 % dimetilsilossano (BP1 o equivalente) con uno spessore uniforme di 0,25 µm ; la colonna deve essere capace di separare i derivati trimetilsililici di lanosterolo e idonea a sitosterolo ; è consigliabile un BP1 avente una lunghezza di 12 m ed un diametro interno di 0,2 mm.

3.10. Microsiringa per gascromatografia, da 1 µl, provvista di ago in acciaio temperato.

4. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di purezza analitica riconosciuta. L'acqua che viene usata deve essere acqua distillata o acqua di purezza perlomeno equivalente.

4.1. Etanolo, avente una purezza di almeno il 95 %.

4.2. Idrossido di potassio, soluzione al 60 % : sciogliere 600 g di idrossido di potassio (purezza minima a 85 %) in acqua e portare al volume di 1 l con acqua.

4.3. Betulino avente una purezza di almeno il 99 %.

4.3.1. Soluzioni di standard interno. Betulino in etere etilico (4.4).

4.3.1.1. La concentrazione della soluzione di betulino usata per la determinazione del sitosterolo deve essere pari a 1,0 mg/ml.

4.3.1.2. La concentrazione della soluzione di betulino usata per la determinazione dello stigmasterolo deve essere pari a 0,4 mg/ml.

4.4. Etere etilico, di purezza analitica (esente da perossidi o da residui).

4.5. Solfato di sodio anidro, granulare, preventivamente essiccato a 102 °C per 2 ore.

4.6. Reagente sililante, ad esempio TRI-SIL (disponibile presso la Pierce Chemical Co., Cat No. 49001) o equivalente. (ATTENZIONE : il TRI-SIL è infiammabile, tossico, corrosivo e forse cancerogeno. Il personale di laboratorio deve conoscere i dati di sicurezza relativi al prodotto e prendere le relative precauzioni.)

4.7. Lanosterolo.

4.8. Sitosterolo, di purezza nota non inferiore al 90 % (P).

Nota 1 : La purezza dei materiali standard usati per la calibratura deve essere determinata con il metodo di normalizzazione. Supporre che tutti gli steroli presenti nel campione siano rappresentati sul cromatogramma, che l'area totale dei picchi rappresenti il 100 % dei costituenti sterolici e che gli steroli diano la stessa risposta al rivelatore. La linearità del sistema deve essere convalidata alle gamme di concentrazione che interessano.

4.8.1. Soluzione standard di sitosterolo : preparare una soluzione contenente, con l'approssimazione di 0,001 mg/ml, circa 0,5 mg/ml (W_1) di sitosterolo (4.8) in etere etilico (4.4).

4.9. Stigmasterolo, di purezza nota non inferiore al 90 % (P).

4.9.1. Soluzione standard di stigmasterolo : preparare una soluzione contenente, con l'approssimazione di 0,001 mg/ml, circa 0,2 mg/ml (W_1) di stigmasterolo (4.9) in etere etilico (4.4).

4.10. Miscela per la prova di risoluzione : preparare una soluzione contenente 0,05 mg/ml di lanosterolo (4.7) e 0,5 mg/ml di sitosterolo (4.8) in etere etilico (4.4).

5. PROCEDIMENTO

5.1. Preparazione di soluzioni standard per cromatografia : la soluzione di standard interno (4.3.1) dev'essere aggiunta alla appropriata soluzione standard di sterolo, nello stesso momento in cui viene aggiunta al campione saponificato (cfr. 5.2.2).

5.1.1. Soluzione cromatografica standard di sitosterolo : trasferire 1 ml di soluzione standard di sitosterolo (4.8.1) in ciascuna delle due fiale (3.7) ed allontanare l'etere etilico in corrente di azoto. Aggiungere 1 ml di soluzione di standard interno (4.3.1.1) e allontanare l'etere etilico in corrente di azoto.

5.1.2. Soluzione cromatografica standard di stigmasterolo : trasferire 1 ml di soluzione standard di stigmasterolo (4.9.1) in ciascuna delle due fiale (3.7) ed eliminare l'etere etilico in corrente di azoto. Aggiungere 1 ml di soluzione di standard interno (4.3.1.2) ed eliminare l'etere etilico in corrente di azoto.

5.2. Preparazione degli insaponificabili.

5.2.1. Fondere il campione di burro ad una temperatura non superiore a 35 °C, agitare vigorosamente ; pesare con l'approssimazione di 1 mg, circa 1 g di burro (W_2) in un pallone da 150 ml (3.1). Aggiungere 50 ml di etanolo (4.1) e 10 ml di soluzione di idrossido di potassio (4.2). Applicare il condensatore a ricadere e scaldare a circa 75 °C per 30 minuti. Staccare il condensatore e raffreddare il pallone a una temperatura prossima a quella ambiente.

5.2.2. Aggiungere 1,0 ml di soluzione di standard interno (4.3.1.1) al pallone se si deve determinare il sitosterolo, oppure di soluzione (4.3.1.2) se si deve determinare lo stigmasterolo. Agitare accuratamente. Trasferire quantitativamente il contenuto dei palloni in un imbuto separatore da 500 ml (3.2), sciacquando il pallone alternativamente con 50 ml d'acqua e 250 ml di etere etilico (4.4). Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per due minuti e lasciare separare le fasi. Eliminare lo stato acquoso inferiore e lavare lo strato etereo agitando con 4 successive aliquote d'acqua da 100 ml ciascuna.

Nota 2 : Per evitare che si formi un'emulsione, è essenziale che i primi due lavaggi con acqua vengano effettuati delicatamente (10 inversioni). Il terzo lavaggio dev'essere effettuato agitando vigorosamente per 30 secondi. Se si forma un'emulsione, essa può essere dissolta aggiungendo 5-10 ml di etanolo. Se si aggiungere l'etanolo, è essenziale effettuare due ulteriori lavaggi vigorosi con acqua.

5.2.3. Far passare lo strato etereo limpido, esente da sapone, attraverso una colonna di vetro (3.5) contenente 30 g di solfato di sodio anidro (4.5). Raccogliere l'etere in un pallone di 250 ml (3.3). Aggiungere granuli regolatori d'ebollizione ed evaporare quasi completamente su bagnomaria o cuffia riscaldante avendo cura di raccogliere i solventi di scarto.

Nota 3: Se gli estratti di campione sono portati a completo essiccamento a una temperatura troppo elevata, si possono verificare perdite di sterolo.

5.3. Preparazione di eteri trimetilsililici.

5.3.1. Trasferire la soluzione eterea che resta nel pallone in una fiala da 2 ml (3.7) aiutandosi con massimo 2 ml di etere etilico ed eliminare l'etere in corrente di azoto. Sciacquare il pallone per due volte con 2 ml di etere etilico, trasferendo nella fiala ed eliminando ogni volta l'etere in corrente di azoto.

5.3.2. Sililare il campione aggiungendo 1 ml di TRI-SIL (4.6). Chiudere la fiala ed agitare vigorosamente fino a scioglimento. Se lo scioglimento è incompleto, scaldare a 65-70 °C. Far riposare per almeno 5 minuti prima di iniettare nel gascromatografo. Sililare gli standard nello stesso modo dei campioni. Sililare la miscela per la prova di risoluzione (4.10) nello stesso modo dei campioni.

Nota 4: La sililazione deve essere effettuata in ambiente anidro. La sililazione incompleta del betulino è indicata da un secondo picco vicino a quello del betulino.

La presenza di etanolo nella fase di sililazione interferisce con la sililazione stessa. Ciò può derivare da un risciacquo insufficiente nella fase di estrazione. Se questo problema persiste, nella fase di estrazione si può effettuare un quinto lavaggio, agitando vigorosamente per 30 secondi.

5.4. Analisi gascromatografica.

5.4.1. Scelta delle condizioni operative.

Regolare il gascromatografo conformemente alle istruzioni del fabbricante.

Le condizioni operative sono le seguenti:

— temperatura della colonna: 265 °C

— temperatura dell'iniettore: 280 °C

— temperatura del rivelatore: 300 °C

— flusso del gas vettore: 0,6 ml/min

— pressione dell'idrogeno: 84 kPa

— pressione dell'aria: 155 kPa

— rapporto di splittagio da 10 : fino a 50 : 1; il rapporto di splittagio deve essere ottimizzato conformemente alle istruzioni del fabbricante e la linearità della risposta del rivelatore deve essere convalidata sulla gamma di concentrazione che interessa.

Nota 5: È importante soprattutto che l'iniettore venga regolarmente pulito.

— Quantitativo di sostanza iniettata, 1 µl di soluzione di TMSE.

Prima di dare inizio a qualsiasi analisi, verificare che il sistema sia in equilibrio in modo da ottenere una risposta sufficientemente stabile.

Queste condizioni possono essere modificate in funzione delle caratteristiche della colonna e del gascromatografo in modo da ottenere cromatogrammi che rispettino i seguenti requisiti:

— il picco del sitosterolo deve essere opportunamente separato da quello del lanosterolo. La figura 1 mostra un tipico cromatogramma che dovrebbe essere ottenuto da una miscela sililata per la prova di risoluzione (4.10),

— i tempi di ritenzione relativi degli steroli sottoindicati devono essere all'incirca i seguenti:

Colesterolo: 1,0

Stigmasterolo: 1,3

Sitosterolo: 1,5

Betulino: 2,5,

— il tempo di ritenzione relativo al betulino deve essere di circa 24 minuti.

5.4.2. Procedimento analitico.

Iniettare 1 µl di soluzione standard silitata (stigmasterolo o sitosterolo) e regolare i parametri di calibrazione dell'integratore.

Iniettare un altro µl di soluzione standard silitata per determinare i fattori di risposta relativi al betulino.

Iniettare 1 µl di soluzione di campione sililata e misurare le aree dei picchi. Ogni cromatografia effettuata deve essere preceduta e seguita da una iniezione di standard. A titolo indicativo, ogni cromatologia deve comprendere sei iniezioni di campione.

Nota 6: L'integrazione del picco dello stigmasterolo deve comprendere le eventuali « code », come definito ai punti 1, 2 e 3 della figura 2 b).

L'integrazione del picco del sitost rolo deve comprendere l'area del picco del 22-diidro-β-sitosterolo (stigmastanolo) che eluisce immediatamente dopo il sitosterolo (vedi figura 3 b) al momento della valutazione del sitosterolo totale.

6. CALCOLO DEI RISULTATI

6.1. Determinare l'area dei picchi degli steroli e del betulino in entrambi gli standard che precedono e seguono un campione e calcolare R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{Area media del picco dello sterolo nello standard}}{\text{Area media del picco del betulino nello standard}}$$

Determinare l'area del picco dello sterolo (stigmasterolo o sitosterolo) e quello del betulino nel campione e calcolare R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{Area del picco dello sterolo nel campione}}{\text{Area del picco del betulino nel campione}}$$

W_1 = quantità di sterolo dello standard (mg) contenuto in 1 ml di soluzione standard (4.8.1 oppure 4.9.1)

W_2 = peso del campione (g) (5.2.1).

P = purezza dello sterolo standard (4.8 oppure 4.9).

$$\text{Tenore di sterolo del campione (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10.$$

7. PRECISIONE DEL METODO

7.1. Ripetibilità.

7.1.1. Stigmasterolo.

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate entro l'intervallo di tempo minimo possibile, da un solo operatore che usa la stessa apparecchiatura su un identico materiale di prova non deve superare 19,3 mg/kg.

7.1.2. Sitosterolo.

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate entro l'intervallo di tempo minimo possibile, da un solo operatore che usa la stessa apparecchiatura su un materiale di prova identico non deve superare 23,0 mg/kg.

7.2. Riproducibilità.

7.2.1. Stigmasterolo.

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate da operatori in diversi laboratori, usando diverse apparecchiature su un identico materiale di prova non deve superare 31,9 mg/kg.

7.2.2. Sitosterolo.

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate da operatori di diversi laboratori, facendo uso di diverse apparecchiature su un identico materiale di prova non deve superare l'8,7 % relativo della media delle determinazioni.

7.3. Fonte dei dati di precisione.

I dati di precisione sono stati determinati con un esperimento eseguito nel 1992 e comprendente 8 laboratori e 6 campioni (3 prove in doppio cieco) per lo stigmaterolo e 6 campioni (3 prove in doppio cieco) per il sitosterolo.

8. LIMITE DI TOLLERANZA

8.1. Dal prodotto tracciato devono essere prelevati tre campioni in modo da controllare l'omogeneità.

8.2. Stigmasterolo.

8.2.1. Il tasso di incorporazione relativo allo stigmasterolo è di 150 g di stigmasterolo puro ad almeno il 95 % per tonnellata di burro, cioè 142,5 mg/kg oppure 170 g di stigmasterolo puro ad almeno l'85 % per tonnellata di burro cioè 144,5 mg/kg.

8.2.2. Se si prende in considerazione la differenza critica per una probabilità del 95 % (CrD_{95}), la media dei 3 risultati non deve essere inferiore a :

126,0 mg/kg, nel caso che sia incorporato stigmasterolo puro al 95 % e a

128,0 mg/kg, nel caso che sia incorporato stigmasterolo puro all'85 %.

8.2.3. In aggiunta ai criteri di cui sopra, il risultato più basso ottenuto dall'analisi del prodotto viene utilizzato per controllare l'omogeneità della distribuzione del tracciante. Ciò viene effettuato mediante un confronto con i seguenti limiti :

— 116,4 mg/kg (il 95 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro al 95 %, prendendo in considerazione un singolo campione a CrD_{95}) ;

— 118,3 mg/kg (il 95 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro all'85 %, prendendo in considerazione un singolo campione a CrD_{95}) ;

— 95,1 mg/kg (l'80 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro al 95 %, prendendo in considerazione un singolo campione a CrD_{95}) ;

— 96,7 mg/kg (l'80 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro all'85 %, prendendo in considerazione un singolo campione a CrD_{95}).

La concentrazione di tracciante nel campione che dà il risultato più basso viene ottenuta mediante interpolazione tra 116,4 mg/kg e 95,1 mg/kg o rispettivamente tra 118,3 mg/kg e 96,7 mg/kg.

8.3. Sitosterolo.

8.3.1. Il tasso di incorporazione per il sitosterolo è di 600 g di sitosterolo puro ad almeno il 90 % per tonnellata di burro, ovvero di 540 mg/kg.

8.3.2. Se si prende in considerazione il CrD_{95}, la media dei 3 risultati non deve essere inferiore a 514,4 mg/kg.

8.3.3. In aggiunta al criterio di cui sopra, il risultato più basso ottenuto dall'analisi del prodotto viene utilizzato per controllare l'omogeneità della distribuzione del tracciante. Ciò viene effettuato mediante un confronto con i seguenti limiti :

— 485,1 mg/kg (il 95 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro al 90 %, prendendo in considerazione un singolo campione CrD_{95}) ;

— 404,1 mg/kg (l'80 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro al 90 %, prendendo in considerazione un singolo campione a CrD_{95}).

La concentrazione di tracciante nel campione che dà il risultato più basso viene ottenuta mediante interpolazione tra 485,1 mg/kg e 404,1 mg/kg.

Figura 1 Cromatogramma della miscela per la prova di risoluzione

È preferibile la risoluzione completa, cioè la traccia del picco relativa al lanosterolo deve raggiungere la linea di base prima di quella del picco del sitosterolo, anche se una risoluzione incompleta è ammissibile.

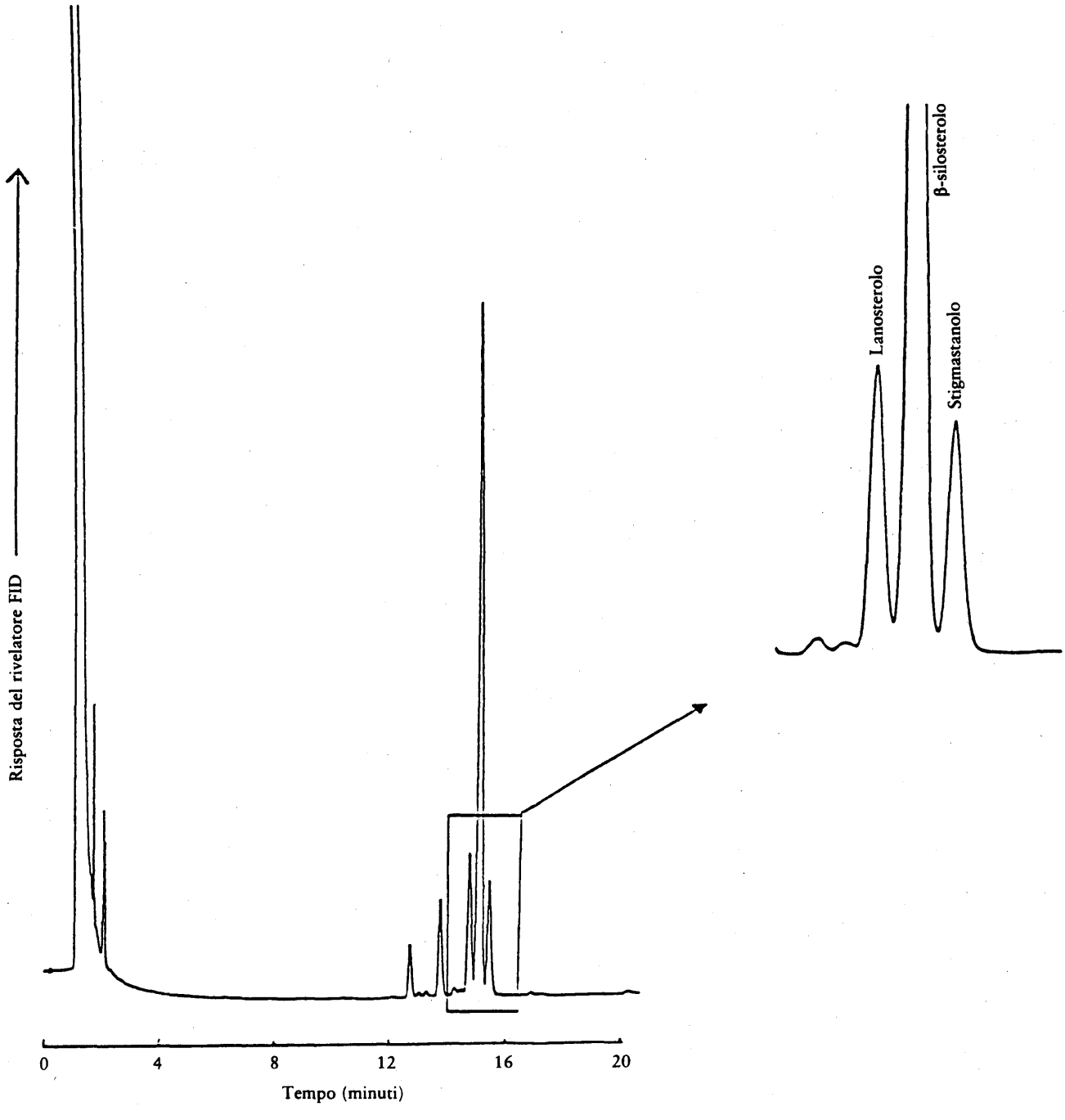


Figura 2a
Standard di stigmasterolo

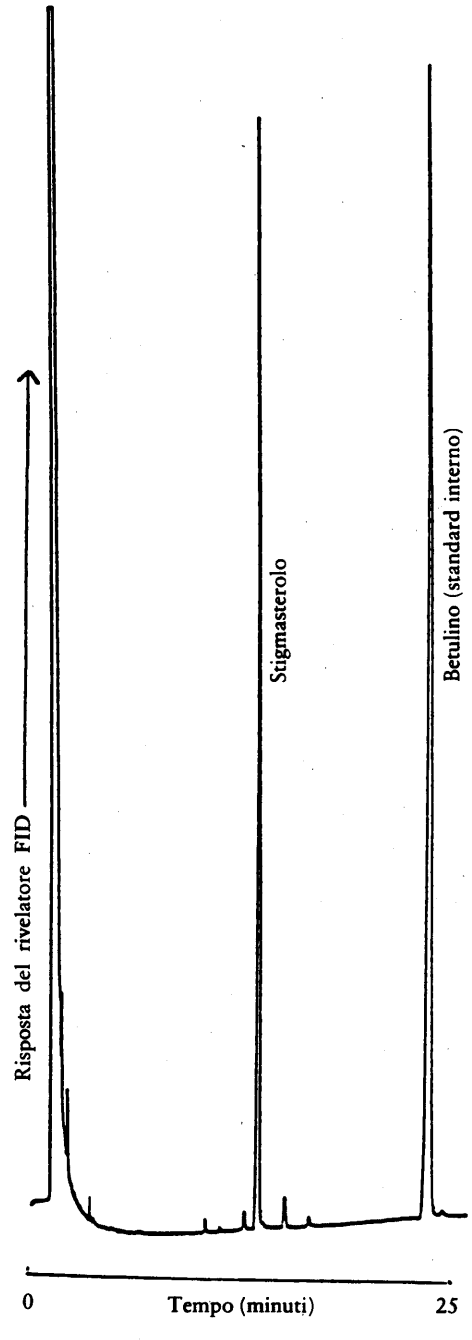
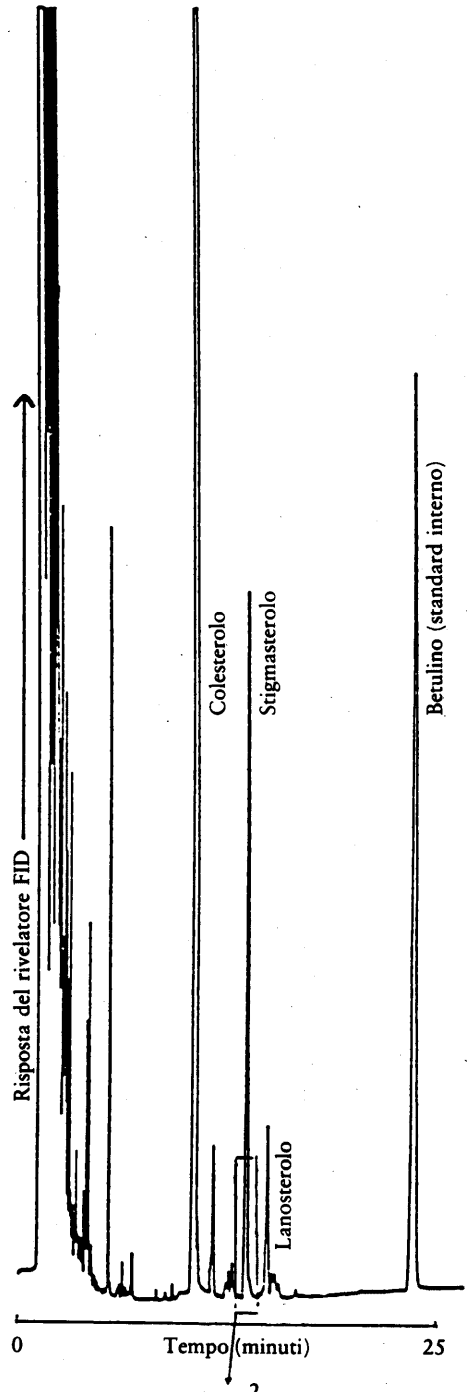
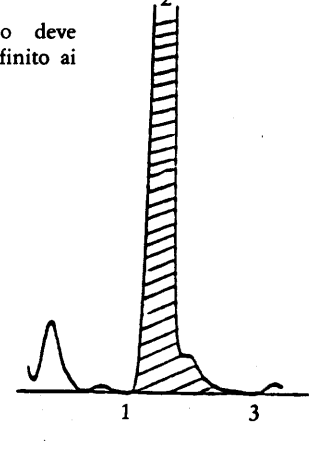


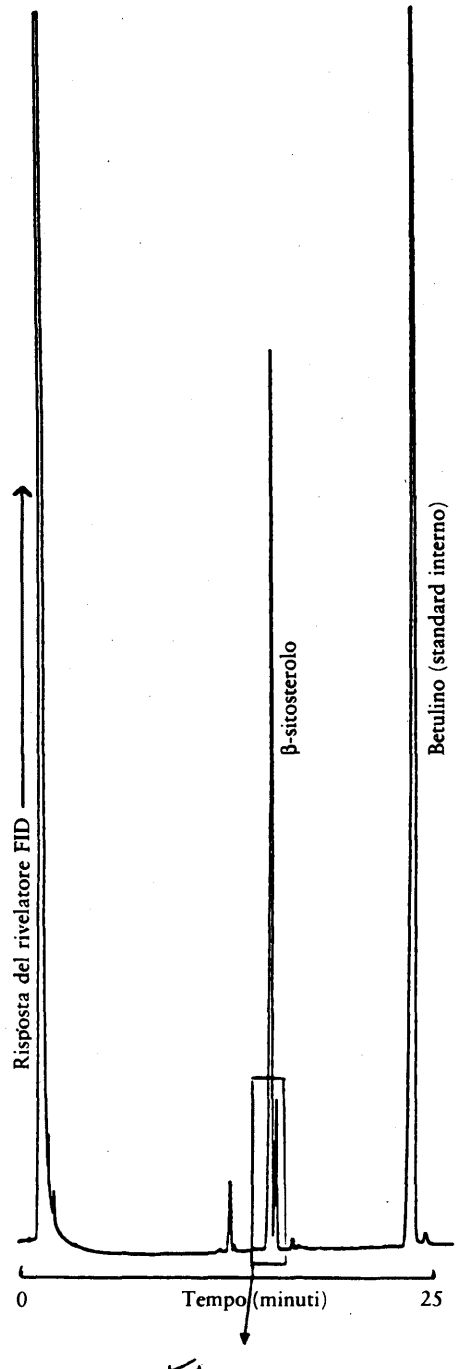
Figura 2b
Campione di burro
denaturato con stigmasterolo





Nota: L'integrazione del picco dello stigmasterolo deve comprendere anche eventuali « code » come definito ai punti 1, 2 e 3.

Figura 3a
Standard di β-sitosterolo



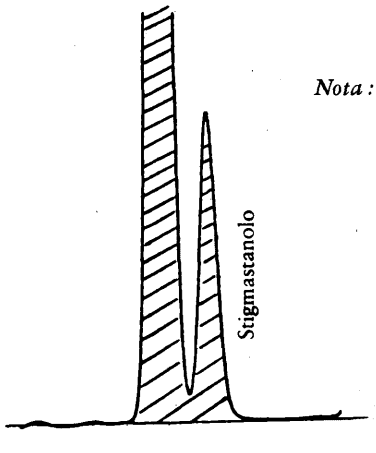
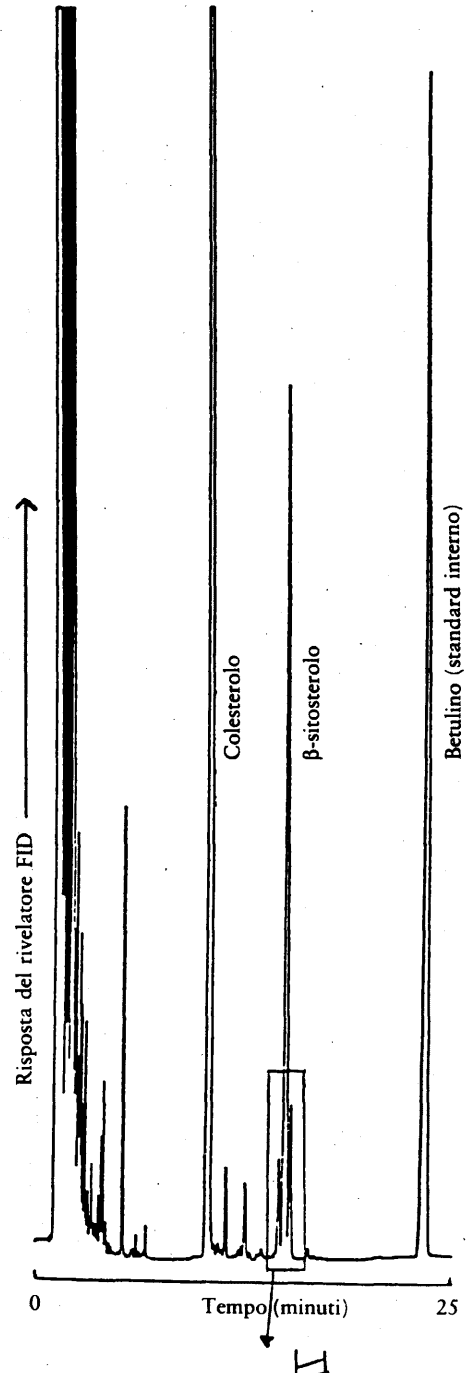
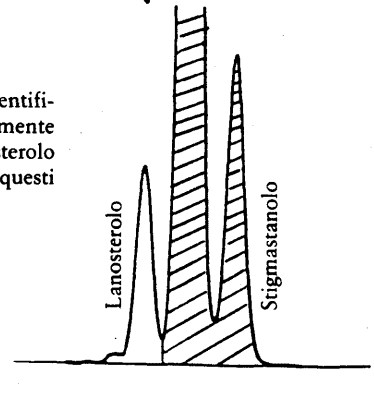


Figura 3b
Campione di burro
denaturato con β-sitosterolo





Nota: Il β-sitosterolo contiene spesso una impurezza (identificata come stigmastanolo) che eluisce immediatamente dopo il β-sitosterolo. Quando si valuta il β-sitosterolo totale presente è necessario sommare le aree di questi due picchi.