

Ce document constitue un outil de documentation et n'engage pas la responsabilité des institutions

► **B**

**RÈGLEMENT (CEE) N° 3942/92 DE LA COMMISSION
du 22 décembre 1992**

**établissant une méthode de référence pour la détermination du sitostérol et du stigmastérol dans le
*butter-oil***

(JO L 399 du 31.12.1992, p. 29)

Modifié par:

	Journal officiel		
	n°	page	date
► <u>M1</u> Règlement (CEE) n° 2539/93 de la Commission du 15 septembre 1993	L 233	1	16.9.1993
► <u>M2</u> Règlement (CE) n° 175/1999 de la Commission du 26 janvier 1999	L 20	22	27.1.1999

▼B

**RÈGLEMENT (CEE) N° 3942/92 DE LA COMMISSION
du 22 décembre 1992**

**établissant une méthode de référence pour la détermination du
sitostérol et du stigmastérol dans le *butter-oil***

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique 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,

considérant que le *butter-oil* doit être marqué et que le *butter-oil* marqué doit être contrôlé conformément au règlement (CEE) n° 3143/85 de la Commission ⁽³⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 1264/92 ⁽⁴⁾, et notamment ses articles 5 et 6;

considérant que le *butter-oil* doit être marqué et que les produits marqués doivent être contrôlés conformément au règlement (CEE) n° 570/88 de la Commission ⁽⁵⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 124/92 ⁽⁶⁾, et notamment ses articles 3 et 6;

considérant que le *butter-oil* doit être marqué et que le *butter-oil* marqué doit être contrôlé conformément au règlement (CEE) n° 429/90 de la Commission ⁽⁷⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 1264/92, et notamment ses articles 10 et 11;

considérant que le strict respect des conditions relatives au marquage du *butter-oil* est indispensable pour prévenir tout risque d'utilisation interdite de beurre susmentionné;

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 qui peut actuellement en résulter du fait des différences dans les méthodes d'analyse nationales;

considérant qu'il est difficile de définir des méthodes de référence d'une manière simultanée pour tous les marqueurs; que la définition d'une méthode de référence pour la détermination du stigmastérol et du sitostérol dans le *butter-oil* constitue un premier pas dans cette direction;

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

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

⁽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 298 du 12. 11. 1985, p. 9.

⁽⁴⁾ JO n° L 135 du 19. 5. 1992, p. 5.

⁽⁵⁾ JO n° L 55 du 1. 3. 1988, p. 31.

⁽⁶⁾ JO n° L 14 du 21. 1. 1992, p. 28.

⁽⁷⁾ JO n° L 45 du 21. 2. 1990, p. 8.

▼B*Article premier***▼M1**

La méthode d'analyse de référence à appliquer pour déterminer la teneur du *butter oil* en stigmastérol, conformément à l'article 6 du règlement (CEE) n° 3143/85, à l'article 6 du ►**M2** règlement (CE) n° 2571/97 ◀ ou à l'article 11 du règlement (CEE) n° 429/90, et pour déterminer la teneur du *butter oil* en β -sitostérol, conformément à l'article 6 du ►**M2** règlement (CE) n° 2571/97 ◀, est indiquée en annexe.

▼B

Le *butter-oil* a été marqué correctement si les résultats obtenus satisfont aux conditions précisées au point 8 de la présente 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 applicable à partir du 1^{er} février 1993.

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

▼B

ANNEXE

DÉTERMINATION DU SITOSTÉROL OU DU STIGMASTÉROL DANS LE BUTTER-OIL PAR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE À L'AIDE D'UNE COLONNE CAPILLAIRE

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode décrit une procédure permettant la détermination quantitative du sitostérol ou du stigmastérol dans le *butter-oil*. 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 des règlements (CEE) n° 3143/85, (CEE) n° 570/88 et (CEE) n° 429/90.

2. PRINCIPE

Le *butter-oil* 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 semblable, destinés à recueillir l'éther à jeter.
- 3.5. Colonne de verre, de 350 mm \times 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 μ m; 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 1 μ l.

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 (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.

▼B

- 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 peroxydes 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 des stérols 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. 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. Peser à 1 mg près, environ 1 g de *butter-oil* (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 étherée 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 lavages à l'eau vigoureux.

- 5.2.3. Faire passer la phase étherée 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

▼B

antiprojection et évaporer jusqu'à la quasi-déshydratation 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 rinçage 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.

Installer 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 par rapport aux concentrations entrant en ligne de compte.

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.

▼B

5.4.2. Protocole analytique:

Injecter 1 µl de solution étalon silylée (stigmastérol ou sitostérol) et ajuster les paramètres de calibrage 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 échantillon silylée 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 du pic de stérol et du pic 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 des deux déterminations effectuées dans l'intervalle de temps le plus court possible pour un opérateur utilisant la même appareillage sur du matériel d'essai identique ne doit pas dépasser 10,2 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 3,6 % par rapport à la moyenne des déterminations.

7.2. Reproductibilité

7.2.1. Stigmastérol

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées par des opérateurs dans différents laboratoires utilisant des appareillages différents sur du matériel d'essai identique ne doit pas dépasser 25,3 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 8,9 % par rapport à la moyenne des déterminations.

7.3. Source de données de précision

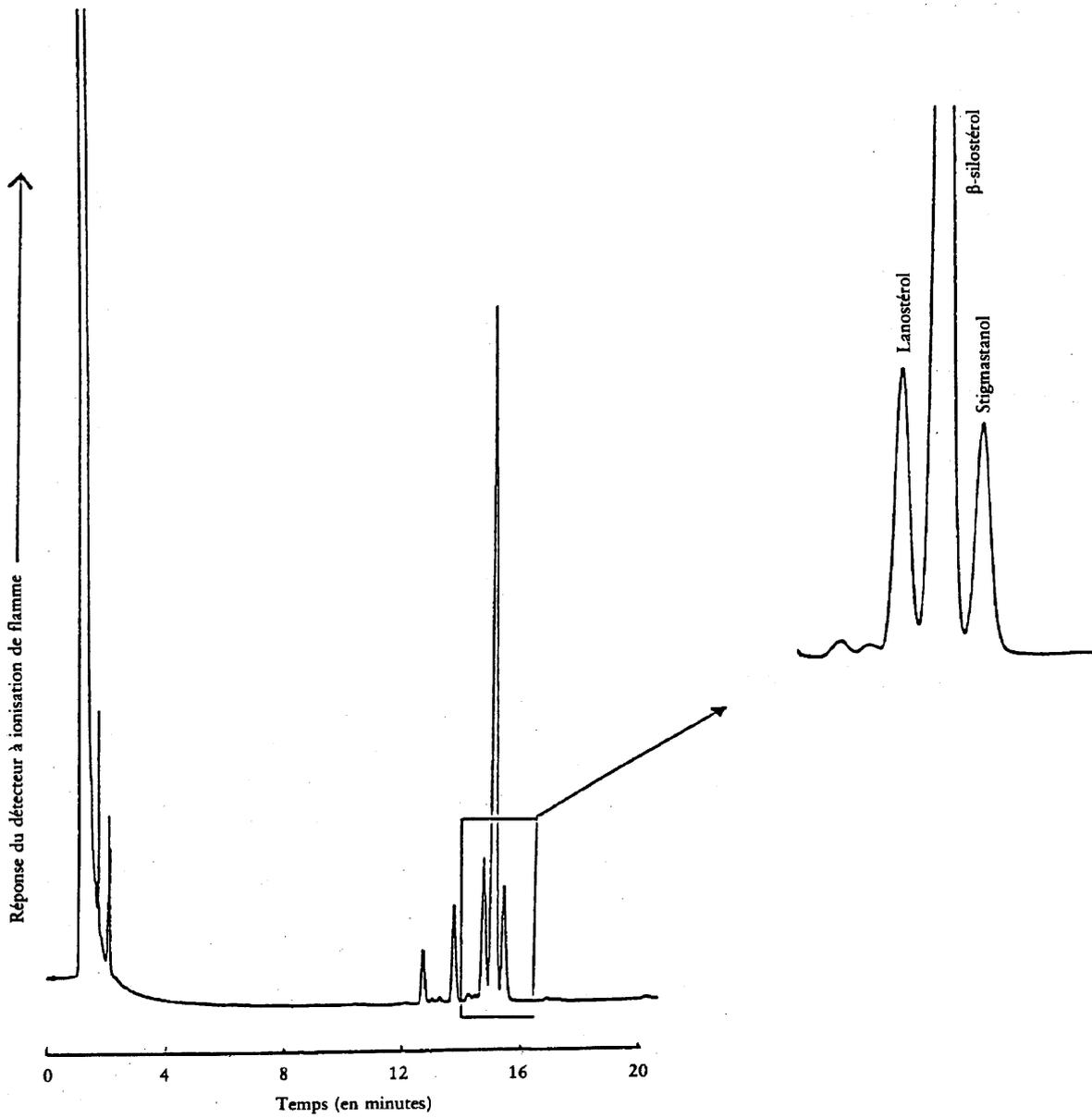
Les données de précision ont été déterminées à partir d'une expérience menée en 1991 impliquant neuf laboratoires et six échantillons (3 en

- ▼B** double aveugle), pour le stigmastérol; six échantillons (3 en double aveugle), pour le sitostérol.
8. LIMITES DE TOLÉRANCE
- ▼M2** 8.1. Pour vérifier si le produit a été tracé correctement, il faut prélever trois échantillons du produit tracé.
- ▼B** 8.2. Stigmastérol
- 8.2.1. Le taux d'incorporation pour le stigmastérol est de 150 g de stigmas-térol, pur au moins à 95 %, par tonne de *butter-oil*, c'est-à-dire 142,5 mg/kg; ou de 170 g de stigmastérol pur au moins à 85 % par tonne de *butter-oil*, soit 144,5 mg/kg.
- ▼M2** 8.2.2. On utilise les résultats obtenus pour les trois échantillons à partir de l'analyse du produit pour vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, et on compare le plus faible de ces résultats avec les limites suivantes [en prenant en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95})]:
- 120,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du stig-mastérol pur à 95 %),
 - 122,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du stig-mastérol pur à 85 %),
 - 84,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmas-térol pur à 95 %),
 - 86,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du stigmas-térol pur à 85 %).
- La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre 120,0 mg/kg et 84,0 mg/kg ou entre 122,0 mg/kg et 86,0 mg/kg.
- ▼B** 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 *butter-oil*, c'est-à-dire 540 mg/kg.
- ▼M2** 8.3.2. On utilise les résultats obtenus pour les trois échantillons à partir de l'analyse du produit pour vérifier le taux et l'homogénéité de l'incorporation du traceur, et on compare le plus faible de ces résultats avec les limites suivantes [en prenant en considération la différence critique pour une probabilité de 95 % (DCr_{95})]:
- 486,0 mg/kg (95 % du taux d'incorporation minimal pour du sitos-térol pur à 90 %),
 - 358,0 mg/kg (70 % du taux d'incorporation minimal pour du sitos-térol pur à 90 %).
- La concentration du traceur dans l'échantillon donnant le résultat le plus faible est utilisée par interpolation entre 486,0 mg/kg et 358,0 mg/kg.

▼B

Figure 1 Chromatogramme du mélange pour le test de résolution

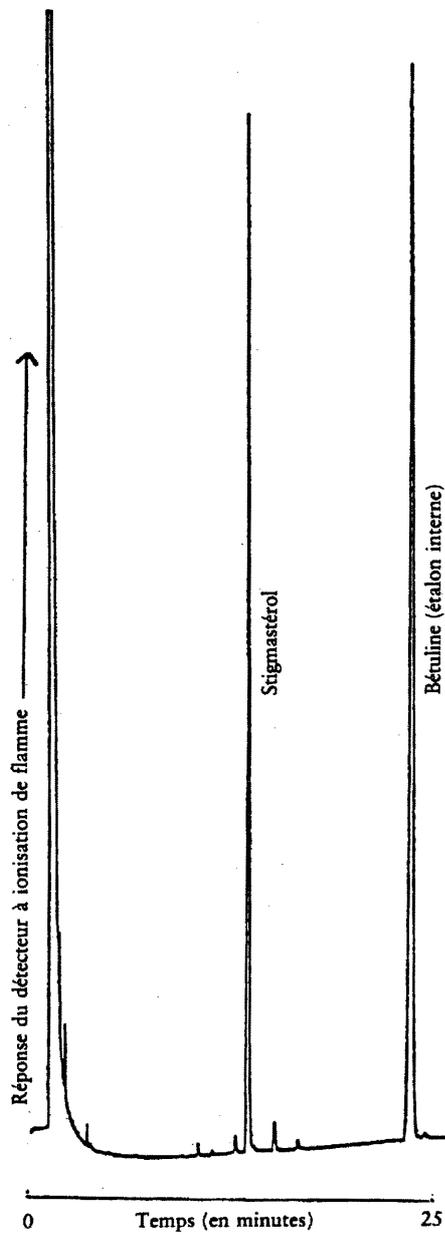
La résolution complète est préférable, c'est-à-dire que le tracé du pic du lanostérol doit rejoindre la ligne de base avant la sortie du pic du sitostérol, quoiqu'une résolution incomplète soit tolérable.



▼B

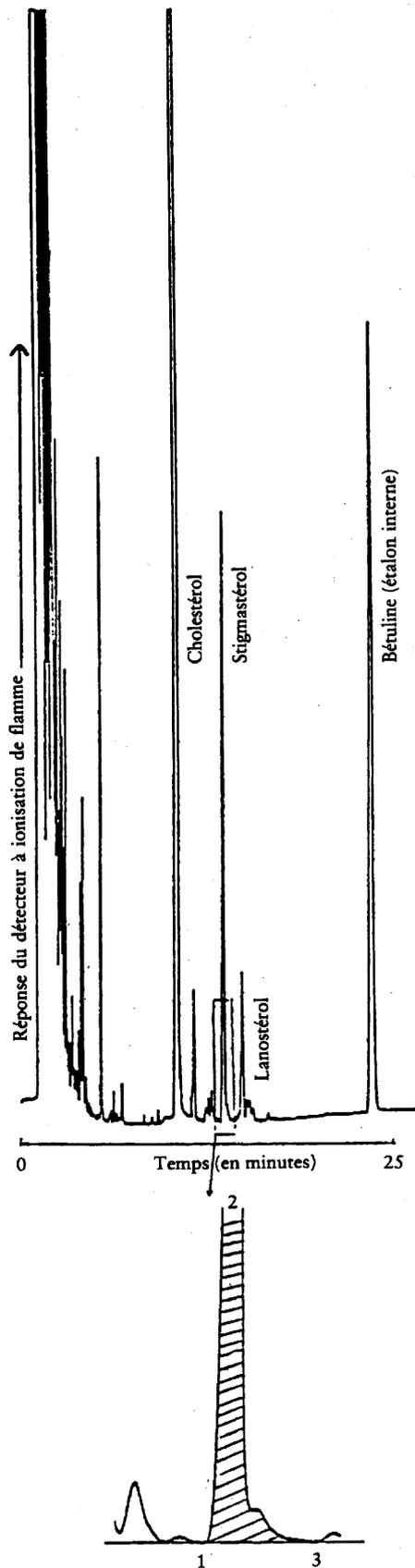
Figure 2a

Stigmastérol étalon



▼B

Figure 2b

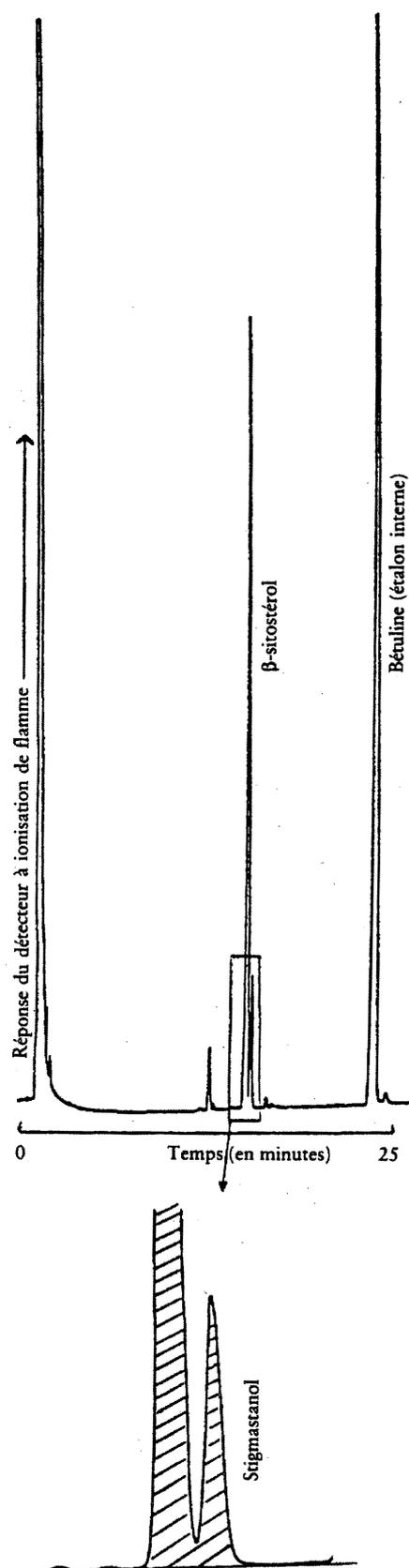
Échantillon de *butter-oil* dénaturé avec du stigmastérol

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

▼B

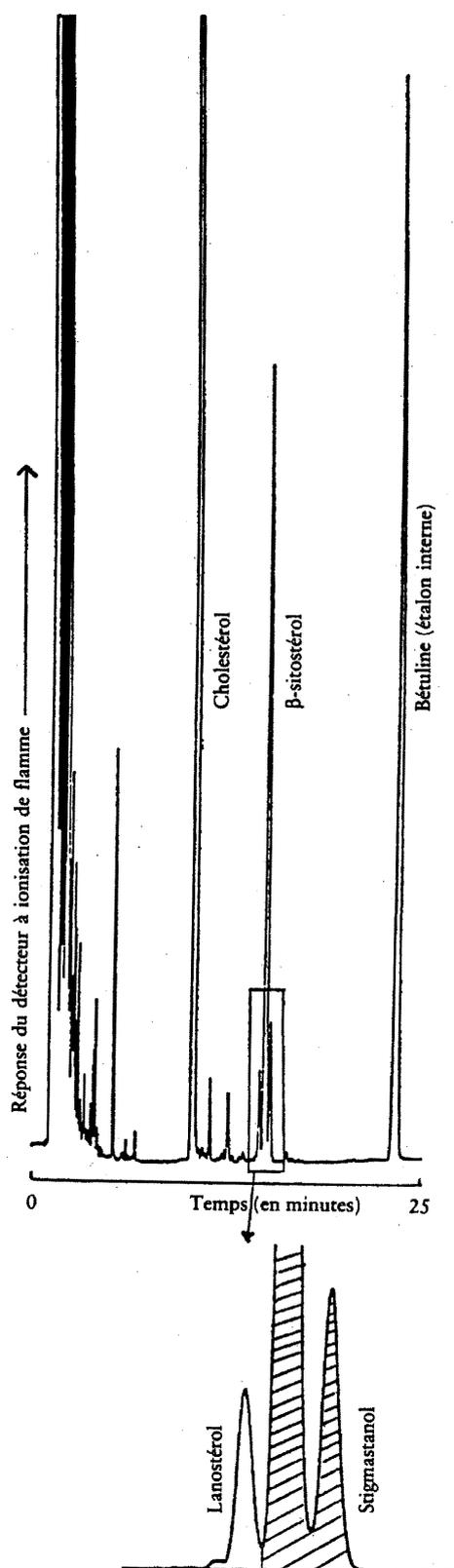
Figure 3a

Sitostérol étalon



▼B

Figure 3b

Échantillon de *butter-oil* 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.