

Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilità delle istituzioni

► **B** **REGOLAMENTO (CEE) N. 3942/92 DELLA COMMISSIONE**
del 22 dicembre 1992
che fissa un metodo di riferimento per la determinazione del sitosterolo e dello stigmasterolo nel
butteroil

(GU L 399 del 31.12.1992, pag. 29)

Modificato da:

	Gazzetta ufficiale		
	n.	pag.	data
► <u>M1</u> Regolamento (CEE) n. 2539/93 della Commissione del 15 settembre 1993	L 233	1	16.9.1993
► <u>M2</u> Regolamento (CE) n. 175/1999 della Commissione del 26 gennaio 1999	L 20	22	27.1.1999

▼B

**REGOLAMENTO (CEE) N. 3942/92 DELLA COMMISSIONE
del 22 dicembre 1992
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 economica 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,

considerando che il burro deve essere marcato e che il burro marcato deve essere controllato ai sensi del regolamento (CEE) n. 3143/75 della Commissione ⁽³⁾, modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 1264/92 ⁽⁴⁾, in particolare gli articoli 5 e 6,

considerando che il burro può essere marcato e che i prodotti marcati devono essere controllati ai sensi del regolamento (CEE) n. 570/88 della Commissione ⁽⁵⁾, modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 124/92 ⁽⁶⁾, in particolare gli articoli 3 e 6;

considerando che il burro deve essere marcato e che il burro marcato deve essere controllato ai sensi del regolamento (CEE) n. 429/90 della Commissione ⁽⁷⁾, modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 1264/92, in particolare gli articoli 10 e 11;

considerando che uno stretto rispetto dei requisiti di marcatura del burro è essenziale per prevenire il rischio di impieghi non autorizzati del burro sovvenzionato;

considerando che, tenuto conto dell'importanza della marcatura ai fini del corretto funzionamento di questi regimi, è necessario fissare metodi comuni per individuare tutti i traccianti richiesti dai regimi stessi da applicare nello stesso modo in tutta la Comunità; che ciò garantirebbe in particolare un equo trattamento di tutti gli operatori che si avvalgono dei suddetti regimi ed eliminerebbe le diverse condizioni di concorrenza che potrebbero risultare dai differenti metodi di analisi nazionali applicati;

considerando che è difficile fissare siffatti metodi di riferimento contemporaneamente per tutti i traccianti; che la fissazione di un metodo di riferimento per la determinazione dello stigmasterolo e del sitosterolo nel burro costituisce un primo passo in questa direzione;

considerando che le disposizioni di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per il latte ed i prodotti lattiero-caseari,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

⁽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 298 del 12. 11. 1985, pag. 9.

⁽⁴⁾ GU n. L 135 del 19. 5. 1992, pag. 5.

⁽⁵⁾ GU n. L 55 dell'1. 3. 1988, pag. 31.

⁽⁶⁾ GU n. L 14 del 21. 1. 1992, pag. 28.

⁽⁷⁾ GU n. L 45 del 21. 2. 1990, pag. 8.

▼B*Articolo 1***▼M1**

Il metodo d'analisi di riferimento per determinare il tenore di stigmasteroide nel butteroil a norma dell'articolo 6 del regolamento (CEE) n. 3143/85, dell'articolo 6 del ►**M2** regolamento (CE) n. 2571/97 ◀ o dell'articolo 11 del regolamento (CEE) n. 429/90 nonché il tenore di beta-sistosterolo nel butteroil a norma dell'articolo 6 del ►**M2** regolamento (CE) n. 2571/97 ◀ è specificato nell'allegato.

▼B

Il butteroil è stato marcato correttamente se i risultati ottenuti sono conformi ai requisiti di cui al paragrafo 8 del presente allegato.

Articolo 2

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

Esso si applica a decorrere dal 1° febbraio 1993.

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



ALLEGATO

**DETERMINAZIONE DEL SITOSTEROLO OPPURE DELLO STIGMA-
STEROLO NEL BUTTEROIL 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 butteroil. 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 dei regolamenti (CEE) n. 3143/85, (CEE) n. 570/88 e (CEE) n. 429/90.

2. PRINCIPIO

Il butteroil 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 facendo riferimento ad uno standard interno a base di betulino.

3. APPARECCHIATURA

- 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 \times 20 mm, provvista di tappo 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 unità 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 BP1 o equivalente con uno spessore uniforme di 0,25 μ m; la colonna deve essere capace di separare i derivati trimetilsililici di lanosterolo e sitosterolo ed 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 μ l, 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 (minimo 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.

▼B

- 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 soluzione standard di sterolo adeguata, 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. Pesare con l'approssimazione di 1 mg, circa 1 g di butteroil (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 lasciar separare le fasi. Eliminare lo strato acquoso inferiore e sciacquare lo strato etero agitando con 4 successive aliquote d'acqua da 100 ml.

Nota 2: Per evitare che si formi un'emulsione, è essenziale che i primi due risciacqui con acqua vengano effettuati delicatamente (10 inversioni). Il terzo risciacquo dev'essere effettuato agitando vigorosamente per 30 secondi. Se si forma un'emulsione, essa può essere dissolta

▼B

aggiungendo 5—10 ml di etanolo. Se si aggiunge l'etanolo, è essenziale effettuare ulteriori due risciacqui 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 cappa isoterma 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) con 2 ml di etere etilico ed eliminare l'etere in corrente di azoto. Sciacquare il pallone con altri 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 in modo da sciogliere. 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 risciacquare per la quinta volta, 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 splittaggio da 10: 1 fino a 50: 1; il rapporto di splittaggio 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, far sì che il sistema si riequilibri e che si ottenga una risposta sufficientemente stabile.

Queste condizioni possono essere modificate alla luce 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.

▼B

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

5.4.2. Procedimento analitico.

Iniettare 1 µl di soluzione standard sililata (stigmasterolo o sitosterolo) e regolare i parametri della taratura integrati).

Iniettare un altro µl di soluzione standard sililata 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 da una iniezione di standard. A titolo indicativo, ogni cromatografia 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 sitosterolo 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 inquadrano una partita 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 10,2 mg/kg.

7.1.2. Sitosterolo

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate nell'intervallo di tempo minimo possibile, da un solo operatore che usa la stessa apparecchiatura su un materiale di prova identico non deve superare il 3,6% riferito alla media delle determinazioni.

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 i 25,3 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'8,9% relativo della media delle determinazioni.

▼B

7.3. Fonte dei dati di precisione.

I dati di precisione sono stati determinati con un esperimento eseguito nel 1991 e comprendente 9 laboratori e 6 campioni (3 prove in doppio cieco) per lo stigmasterolo e 6 campioni (3 prove in doppio cieco) per il sitosterolo.

8. LIMITI DI TOLLERANZA

▼M2

8.1. Per verificare che l'incorporazione dei traccianti ha avuto luogo correttamente, dal prodotto tracciato devono essere prelevati tre campioni.

▼B

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 butteroil, cioè 142,5 mg/kg oppure 170 g di stigmasterolo puro ad almeno l'85 % per tonnellata di butteroil, cioè 144,5 mg/kg.

▼M2

8.2.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni del prodotto vengono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del tracciante: il risultato più basso ottenuto dall'analisi del prodotto viene confrontato con i seguenti limiti [si prende in considerazione la differenza critica per una probabilità del 95 % (CrD95)]:

- 120,0 mg/kg (il 95 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro al 95 %),
- 122,0 mg/kg (il 95 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro all'85 %),
- 84,0 mg/kg (il 70 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro al 95 %),
- 86,0 mg/kg (il 70 % del tasso minimo di incorporazione per stigmasterolo puro all'85 %).

La concentrazione di tracciante nel campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione tra 120,0 mg/kg e 84,0 mg/kg o rispettivamente tra 122,0 mg/kg e 86,0 mg/kg.

▼B

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 butteroil, ovvero di 540 mg/kg.

▼M2

8.3.2. I risultati dell'analisi dei tre campioni del prodotto vengono utilizzati per verificare il tasso e l'omogeneità di incorporazione del tracciante: il risultato più basso ottenuto dall'analisi del prodotto viene confrontato con i seguenti limiti [si prende in considerazione la differenza critica per una probabilità del 95 % (CrD95)]:

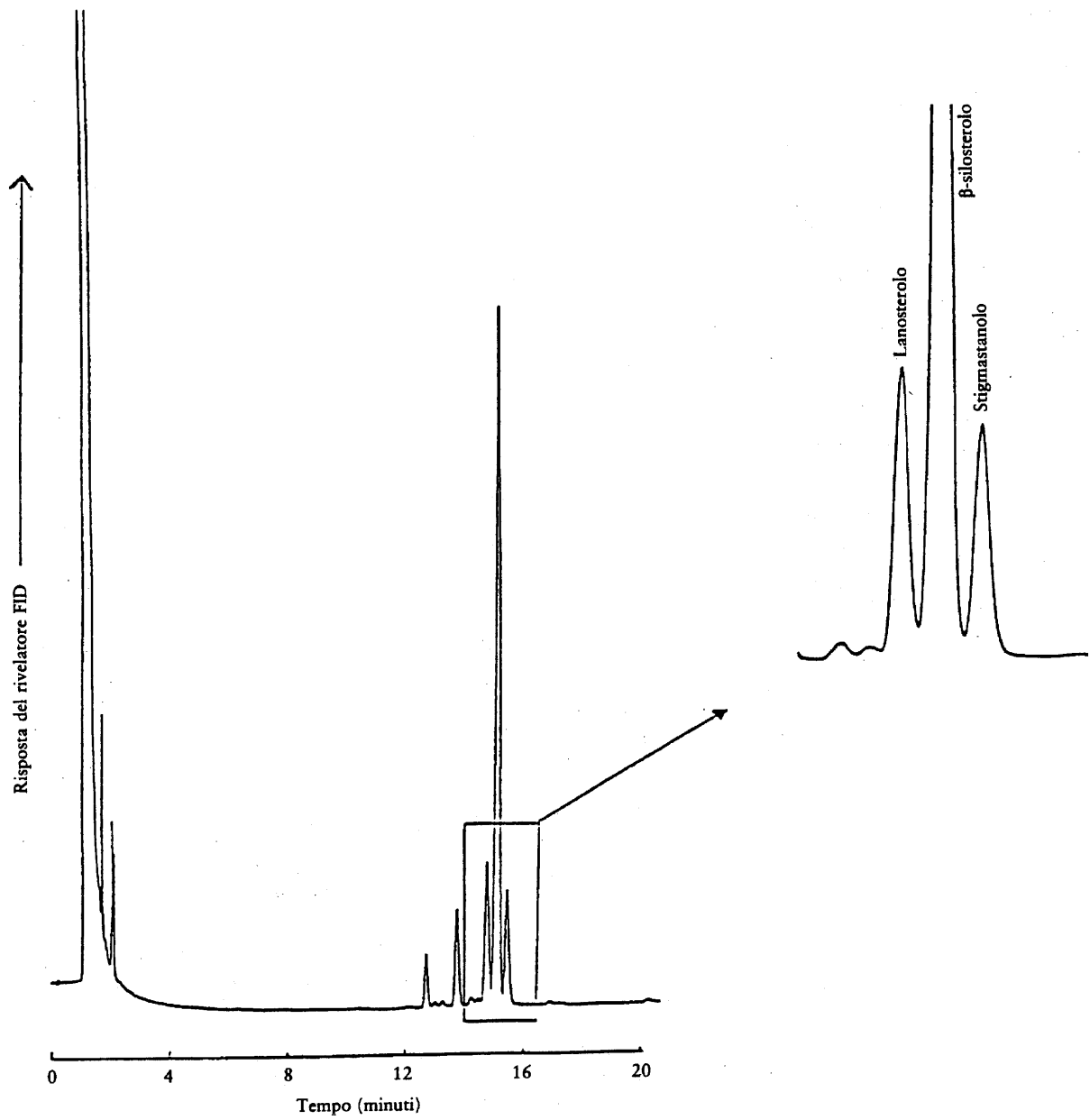
- 486,0 mg/kg (il 95 % del tasso minimo di incorporazione per sitosterolo puro al 90 %),
- 358,0 mg/kg (il 70 % del tasso minimo di incorporazione per sitosterolo puro al 90 %).

La concentrazione di tracciante nel campione che dà il risultato più basso viene utilizzata per interpolazione tra 486,0 mg/kg e 358,0 mg/kg.

▼B

Figura 1 Cromatogramma della miscela per la prova di risoluzione

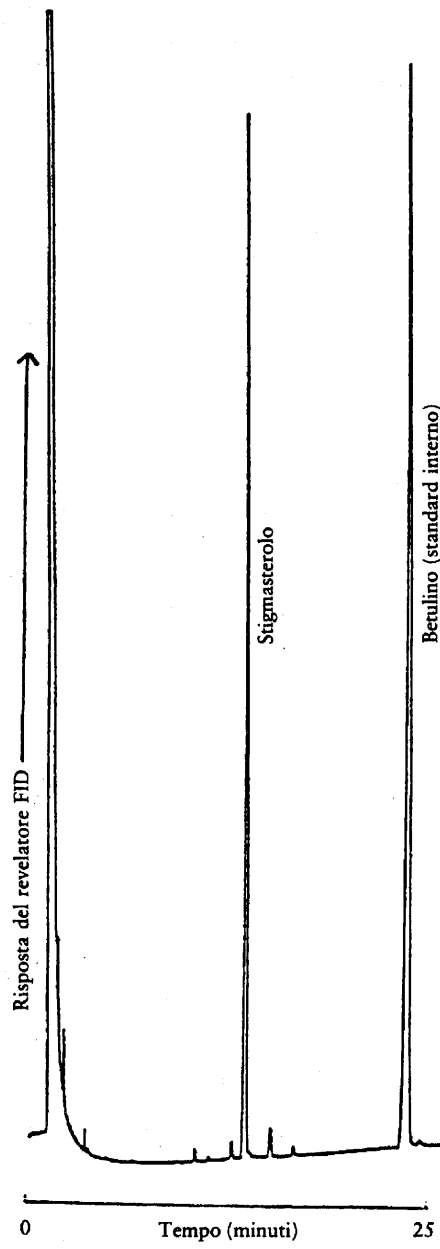
È preferibile la risoluzione completa, cioè la traccia del picco relativa al lanosterolo deve raggiungere la linea di base prima di quella del picco sitosterolo, anche se una risoluzione incompleta è ammissibile.



▼B

Figura 2a

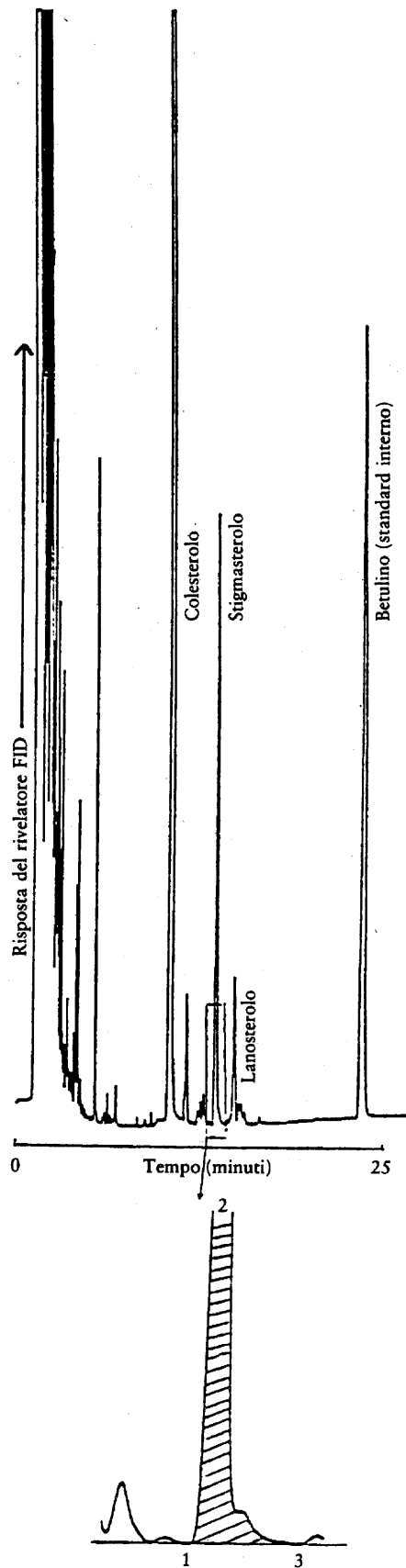
Standard di stigmasterolo



▼B

Figura 2b

Campione di butteroil denaturatocon:

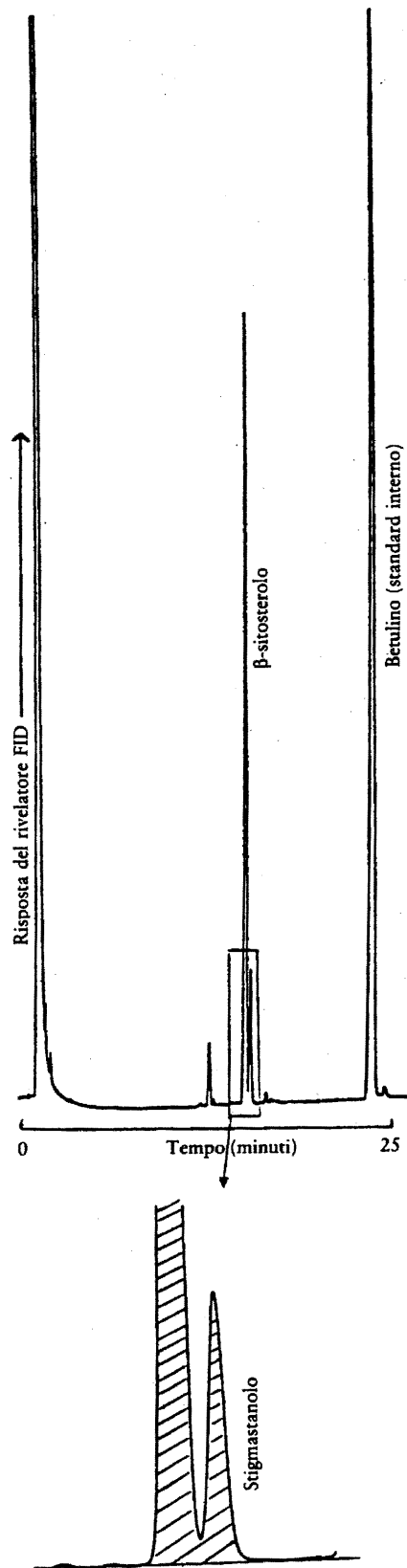


Nota: L'integrazione del picco dello stigmasterolo deve comprendere anche eventuali «code» come definito ai punti 1, 2 e 3.

▼B

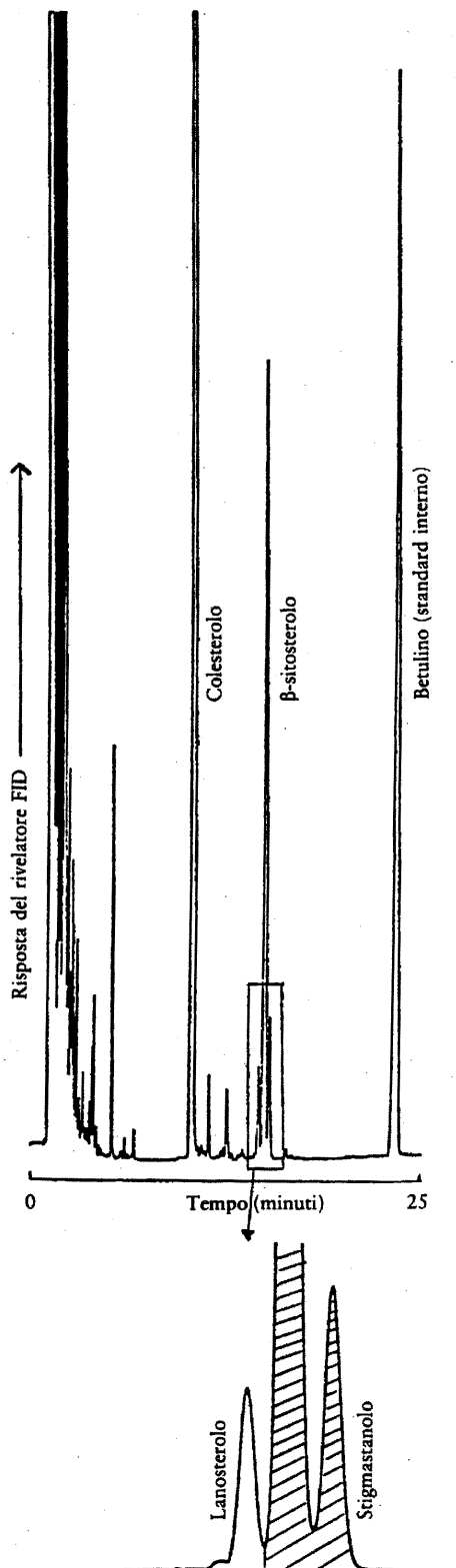
Figura 3a

Standard di sitosterolo



▼B

Figura 3b

Campione di butteroil 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.