

REGLAMENTO (CE) N° 86/94 DE LA COMISIÓN

de 19 de enero de 1994

por el que se establece un método de referencia para la determinación del contenido de sitosterol y estigmasterol en la mantequilla

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CEE) n° 804/68 del Consejo, de 27 de junio de 1968, por el que se establece la organización común de mercados en el sector de la leche y de los productos lácteos⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CEE) n° 2071/92⁽²⁾, y, en particular, el apartado 7 de su artículo 6,

Considerando que la mantequilla puede marcarse y que los productos marcados deben controlarse con arreglo a los artículos 3 y 6 del Reglamento (CEE) n° 570/88 de la Comisión⁽³⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 3049/93⁽⁴⁾;

Considerando que, para prevenir el riesgo de uso indebido de mantequilla subvencionada, es necesario que se cumplan estrictamente las condiciones de marcado de la mantequilla;

Considerando que, habida cuenta de la importancia del mercado para el correcto funcionamiento del sistema, es necesario establecer métodos comunes para la detección de todos los marcadores que éste requiera, aplicables por igual en toda la Comunidad; que con ello se pretende, en particular, garantizar un trato equitativo a todos los agentes económicos que se acojan a estos sistemas y eliminar las diferencias de las condiciones de competencia que pueden existir actualmente debido a los diferentes métodos de análisis nacionales;

Considerando que el Reglamento (CEE) n° 3942/92 de la Comisión⁽⁵⁾ establece un método de referencia para la determinación del contenido de sitosterol y estigmasterol

en el butteroil; que este método puede aplicarse, con ligeras modificaciones, a la determinación de los marcadores de esterol en la mantequilla;

Considerando la necesidad de determinar la precisión del método y sus límites de tolerancia;

Considerando que las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión de la leche y de los productos lácteos,

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El método de análisis de referencia que se utilizará para determinar el contenido de estigmasterol o de β -sitosterol en la mantequilla con arreglo al artículo 6 del Reglamento (CEE) n° 570/88 es el que figura en el Anexo.

La mantequilla habrá sido correctamente marcada cuando los resultados obtenidos respondan a los requisitos enunciados en el apartado 8 del Anexo.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

Será aplicable a partir del 1 de abril de 1994.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 19 de enero de 1994.

Por la Comisión

René STEICHEN

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO n° L 148 de 28. 6. 1968, p. 13.

⁽²⁾ DO n° L 215 de 30. 7. 1992, p. 64.

⁽³⁾ DO n° L 55 de 1. 3. 1988, p. 31.

⁽⁴⁾ DO n° L 273 de 5. 11. 1993, p. 7.

⁽⁵⁾ DO n° L 399 de 31. 12. 1992, p. 29.

ANEXO

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SITOSTEROL Y ESTIGMASTEROL EN LA MANTEQUILLA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES EN COLUMNA CAPILAR**1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN**

El presente método describe un procedimiento para la determinación del contenido de sitosterol y estigmasterol en la mantequilla. Se considera sitosterol la suma de β -sitosterol y 22-dihidro- β -sitosterol; los demás sitosteroles se consideran sin importancia. Se utilizarán muestras recibidas de conformidad con el Reglamento (CEE) nº 570/88.

2. PRINCIPIO

Saponificación de la mantequilla con una solución etanólica de hidróxido de potasio y extracción de los insaponificables con éter dietílico.

Los esteroides se transforman en trimetilsililéteres y se analizan mediante cromatografía de gases en columna capilar con referencia a un patrón interno de betulina.

3. MATERIAL

- 3.1. Matraz de saponificación de 150 ml, provisto de refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- 3.2. Ampollas de decantación de 500 ml.
- 3.3. Matraces de 250 ml.
- 3.4. Embudos compensadores de presión, de 250 ml o similares, para recoger el sobrante de éter dietílico.
- 3.5. Columna de vidrio de 350 mm \times 20 mm provista de un tapón de vidrio sinterizado.
- 3.6. Baño maría u otro sistema termostatzado.
- 3.7. Viales para reacción de 2 ml.
- 3.8. Equipo de cromatografía de gases que pueda funcionar con columna capilar, provisto de un sistema de división de flujo y formado por:
 - 3.8.1. Una cámara termostática para columnas, capaz de mantener la temperatura deseada con una precisión de $\pm 1^\circ\text{C}$.
 - 3.8.2. Una unidad de vaporización de temperatura ajustable.
 - 3.8.3. Un detector de ionización de llama y convertidor-amplificador.
 - 3.8.4. Un integrador-registrador que pueda funcionar con el convertidor-amplificador (3.8.3).
- 3.9. Columna capilar de sílice fundida, recubierta completamente de BP1 o material equivalente, con un espesor uniforme de 0,25 μm ; la columna debe ser capaz de separar los trimetilsililderivados del lanosterol y del sitosterol; es adecuada una columna con BP1, de 12 m de longitud y 0,2 mm de diámetro interior.
- 3.10. Microjeringa de 1 μl para cromatografía de gases, con aguja endurecida (3.8.2).

4. REACTIVOS

Todos los reactivos deberán ser de grado analítico reconocido. El agua utilizada deberá ser agua destilada o de pureza al menos equivalente.

- 4.1. Etanol de una pureza mínima del 95 %.
- 4.2. Solución de hidróxido de potasio al 60 % : disolver 600 g de hidróxido de potasio (del 85 % como mínimo) en agua y completar hasta un litro con agua.
- 4.3. Betulina de una pureza mínima del 99 %.
- 4.3.1. Soluciones de patrón interno. Betulina en éter dietílico (4.4) :

- 4.3.1.1. La concentración de la solución de betulina usada para la determinación del contenido de sitosterol será de 1,0 mg/ml.
- 4.3.1.2. La concentración de la solución de betulina usada para la determinación del contenido de estigmasterol será de 0,4 mg/ml.
- 4.4. Éter dietílico de calidad para análisis (sin peróxidos ni residuos).
- 4.5. Sulfato sódico anhidro granulado, secado previamente a 102 °C durante dos horas.
- 4.6. Reactivo de sililación, por ejemplo TRI-SIL (distribuido por Pierce Chemical Co, número de catálogo 49001) o equivalente. (ATENCIÓN: el TRI-SIL es tóxico, inflamable, corrosivo y posiblemente cancerígeno. El personal de laboratorio deberá conocer bien las medidas de seguridad para trabajar con TRI-SIL y adoptar las debidas precauciones.)
- 4.7. Lanosterol.
- 4.8. Sitosterol de una pureza conocida del 90 % como mínimo (P).

Nota 1: La pureza de los materiales patrón utilizados para el calibrado deberá determinarse usando el método de normalización. Considérese que todos los esteroides presentes en la muestra están representados en el cromatograma, que el área total de los picos representa el 100 % de los componentes esteróicos y que los esteroides dan la misma respuesta a la detección. La linealidad del sistema deberá ser validada en la zona de concentraciones de interés.

- 4.8.1. Solución patrón de sitosterol: preparar una solución que contenga aproximadamente 0,5 mg/ml (W_1) de sitosterol (4.8) en éter dietílico (4.4), con una precisión de 0,001 mg/ml.
- 4.9. Estigmasterol, de una pureza conocida del 90 % como mínimo (P).
- 4.9.1. Solución patrón de estigmasterol: preparar una solución que contenga aproximadamente 0,2 mg/ml (W_1) de estigmasterol (4.9) en éter dietílico (4.4), con una precisión de 0,001 mg/ml.
- 4.10. Mezcla para la prueba de resolución: preparar una solución que contenga 0,05 mg/ml de lanosterol (4.7) y 0,5 mg/ml de sitosterol en éter dietílico (4.4).

5. PROCEDIMIENTO

- 5.1. Preparación de las soluciones patrón para cromatografía.

La solución de patrón interno (4.3.1) debe añadirse a la solución patrón de esteroles correspondiente a la vez que se añade a la muestra saponificada (véase 5.2.2).
- 5.1.1. Solución cromatográfica patrón de sitosterol; pasar 1 ml de solución patrón de sitosterol (4.8.1) a 2 viales de reacción (3.7) y eliminar el éter dietílico con una corriente de nitrógeno. Añadir 1 ml de solución de patrón interno (4.3.1.1) y eliminar el éter dietílico con una corriente de nitrógeno.
- 5.1.2. Solución cromatográfica patrón de estigmasterol; pasar 1 ml de solución patrón de estigmasterol (4.9.1) a 2 viales de reacción (3.7) y eliminar el éter dietílico con una corriente de nitrógeno. Añadir 1 ml de solución de patrón interno (4.3.1.2) y eliminar el éter dietílico con una corriente de nitrógeno.
- 5.2. Preparación de los insaponificables.
 - 5.2.1. Fundir la muestra de mantequilla a una temperatura que no exceda 35 °C, mezclar perfectamente la muestra removiéndola. Pesar en un matraz de 150 ml (3.1) con precisión de 1 mg alrededor de 1 g de mantequilla (W_2). Añadir 50 ml de etanol (4.1) y 10 ml de solución de hidróxido de potasio (4.2). Colocar el refrigerante de reflujo y calentar a unos 75 °C durante 30 minutos. Desmontar el refrigerante y enfriar el matraz hasta una temperatura próxima a la del ambiente.
 - 5.2.2. Añadir 1,0 ml de solución de patrón interno (4.3.1.1) al matraz si va a determinarse el sitosterol, o bien (4.3.1.2) si se va a determinar el estigmasterol. Homogeneizar completamente. Pasar cuantitativamente el contenido del matraz a una ampolla de decantación de 500 ml (3.2) y lavar el matraz por orden con 50 ml de agua y 250 ml de éter dietílico (4.4). Agitar enérgicamente la ampolla de decantación durante 2 minutos y dejar que se separen las fases. Eliminar la capa acuosa inferior y lavar la capa etérea agitándola sucesivamente con 4 porciones de 100 ml de agua.

Nota 2: Para evitar que se forme una emulsión, es fundamental que los dos primeros lavados con agua se realicen suavemente (diez inversiones). El tercer lavado puede hacerse agitando enérgicamente durante 30 segundos. Si se forma una emulsión, puede deshacerse añadiendo de 5 a 10 ml de etanol. Si se añade etanol, es necesario realizar otros dos lavados enérgicos con agua.

- 5.2.3. Pasar la capa etérea transparente y exenta de jabones a través de una columna de vidrio (3.5) que contenga 30 g de sulfato sódico anhidro (4.5). Recoger el éter en un matraz de 250 ml (3.3). Añadir material para regular la ebullición y evaporar casi hasta sequedad con baño maría u otro sistema termostatzado, recogiendo los disolventes residuales.

Nota 3: Si los extractos de la muestra se llevan a sequedad completa a una temperatura demasiado elevada, pueden darse pérdidas de esteroides.

- 5.3. Preparación de los trimetilsililéteres.

- 5.3.1. Pasar la solución etérea restante en el matraz a un vial de reacción de 2 ml (3.7) con 2 ml de éter dietílico y eliminar el éter con una corriente de nitrógeno. Lavar el matraz dos veces con sendas porciones de 2 ml de éter dietílico, pasando el líquido al vial y eliminando el éter con nitrógeno cada vez.

- 5.3.2. Sililar la muestra añadiendo 1 ml de TRI-SIL (4.6). Cerrar el vial y agitar enérgicamente para disolver el contenido. Si la disolución no es completa, calentar hasta 65-70 °C. Dejar en reposo durante al menos 5 minutos antes de inyectar en el cromatógrafo de gases. Sililar los patrones de la misma forma que las muestras. Sililar la mezcla para la prueba de resolución (4.10) de la misma forma que las muestras.

Nota 4: La sililación debe realizarse en ausencia de agua. Si la betulina se silila de forma incompleta, aparece un segundo pico próximo al de la betulina.

La presencia de etanol en la fase de sililación interfiere con este proceso. El etanol puede estar presente cuando el lavado en la fase de extracción no es el adecuado. Si este problema persiste, puede realizarse un quinto lavado, agitando enérgicamente durante 30 segundos, en la fase de extracción.

- 5.4. Análisis por cromatografía de gases.

- 5.4.1. Condiciones de funcionamiento:

Ajustar el cromatógrafo de gases con arreglo a las instrucciones del fabricante.

Las condiciones de funcionamiento son las siguientes:

- temperatura de la columna: 265 °C
- temperatura del inyector: 280 °C
- temperatura del detector: 300 °C
- velocidad del gas portador: 0,6 ml/minuto
- presión de hidrógeno: 84 kPa
- presión del aire: 155 kPa
- división de la muestra 10 :1 a 50 :1; la proporción de división debe optimizarse con arreglo a las instrucciones del fabricante, y después debe validarse la linealidad de la respuesta del detector en toda la zona de concentraciones de interés.

Nota 5: Es fundamental limpiar regularmente la camisa del inyector.

- cantidad de sustancia inyectada: 1 µl de solución de TMSE.

Hay que dejar que el sistema se equilibre hasta obtener una respuesta de estabilidad satisfactoria antes de comenzar el análisis.

Estas condiciones pueden modificarse según las características de la columna y del cromatógrafo de gases con el fin de obtener cromatogramas que cumplan los siguientes requisitos:

- el pico de sitosterol debe estar suficientemente separado del de lanosterol. La figura 1 muestra un cromatograma típico como el que debe obtenerse con una mezcla sililada para la prueba de resolución (4.10),
- los tiempos relativos de retención de los siguientes esteroides deben aproximarse a los valores indicados a continuación:

Colesterol:	1,0
Estigmasterol:	1,3
Sitosterol:	1,5
Betulina:	2,5,
- el tiempo de retención de la betulina debe ser 24 minutos aproximadamente.

5.4.2. Procedimiento analítico :

Inyectar 1 µl de solución patrón sililada (estigmasterol o sitosterol) y ajustar los parámetros de calibración del integrador.

Inyectar otra vez 1 µl de solución patrón sililada para determinar los factores de respuesta en relación con la betulina.

Inyectar 1 µl de solución de muestra sililada y medir las áreas de los picos. Cada tanda cromatográfica debe ir precedida y seguida por una inyección de patrones. Como orientación pueden incluirse seis inyecciones de muestra en cada tanda así controlada.

Nota 6: La integración del pico del stigmasterol debe incluir las posibles colas según se define con los puntos 1, 2 y 3 de la figura 2 b.

La integración del pico del sitosterol debe incluir el área del pico del 22-dihidro-β-sitosterol (estigmasteranol) que eluye inmediatamente después del sitosterol (véase la figura 3 b), cuando se evalúe el sitosterol total.

6. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- 6.1. Determinar el área de los picos de los esteroides y de la betulina en los dos patrones que preceden y siguen a una tanda y calcular R_1 :

$$R_1 = \frac{\text{Área media del pico del esteroide en el patrón}}{\text{Área media del pico de la betulina en el patrón}}$$

Determinar el área del pico del esteroide (estigmasterol o sitosterol) y del pico de la betulina en la muestra y calcular R_2 :

$$R_2 = \frac{\text{Área del pico del esteroide en la muestra}}{\text{Área del pico de la betulina en la muestra}}$$

W_1 = Contenido en esteroide del patrón (mg) incluido en 1 ml de solución patrón (4.8.1 o 4.9.1)

W_2 = peso de la muestra (g) (5.2.1)

P = pureza del esteroide patrón (4.8 o 4.9)

$$\text{Contenido en esteroide de la muestra (mg/kg)} = \frac{R_2}{R_1} \times \frac{W_1}{W_2} \times P \times 10.$$

7. PRECISIÓN DEL MÉTODO

7.1. Repetibilidad

7.1.1. Estigmasterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas dentro del período de tiempo más breve posible, por un mismo operador, utilizando el mismo equipo y con el mismo material problema, no deberá exceder de 19,3 mg/kg.

7.1.2. Sitosterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas en el período de tiempo más breve posible, por un mismo operador, utilizando el mismo equipo y con el mismo material problema, no excederá del 23,0 mg/kg respecto a la media de las determinaciones.

7.2. Reproducibilidad

7.2.1. Estigmasterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas por operadores de diferentes laboratorios, utilizando equipos diferentes y con el mismo material problema, no excederá de 31,9 mg/kg.

7.2.2. Sitosterol

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones realizadas por operadores de diferentes laboratorios, utilizando equipos diferentes y con el mismo material problema, no excederá del 8,7 % respecto a la media de las determinaciones.

- 7.3. Fuente de los datos sobre la precisión
- Los datos sobre la precisión proceden de un experimento realizado en 1992 en el que participaron ocho laboratorios y seis muestras (tres duplicados ciegos) para el estigmasterol y seis muestras (tres duplicados ciegos) para el sitosterol.
8. LÍMITES DE TOLERANCIA
- 8.1. Deben tomarse tres muestras del producto marcado para comprobar la homogeneidad.
- 8.2. Estigmasterol
- 8.2.1. La proporción de incorporación del estigmasterol es de 150 gramos de estigmasterol de una pureza mínima del 95 % por tonelada de mantequilla, es decir, 142,5 mg/kg; o bien 170 gramos de estigmasterol de una pureza mínima del 85 % por tonelada de mantequilla, es decir, 144,5 mg/kg.
- 8.2.2. Teniendo en cuenta la diferencia crítica de un nivel de probabilidad del 95 % (CrD_{95}), la media de los tres resultados no será inferior a:
- 126,0 mg/kg en caso de que se incorpore estigmasterol de una pureza mínima del 95 %,
128,0 mg/kg en caso de que se incorpore estigmasterol de una pureza mínima del 85 %.
- 8.2.3. Además de los criterios indicados en el punto 8.2.2, el resultado más bajo obtenido en los análisis del producto se empleará para comprobar la homogeneidad de la distribución del marcador. Este proceso se realizará mediante comparación con los siguientes límites:
- 116,4 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza mínima del 95 %, y sólo se tiene en cuenta una única muestra de CrD_{95});
 - 118,3 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza mínima del 85 %, y sólo se tiene en cuenta una única muestra de CrD_{95});
 - 95,1 mg/kg (el 80 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza mínima del 95 %, y sólo se tiene en cuenta una única muestra de CrD_{95});
 - 96,7 mg/kg (el 80 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a estigmasterol de una pureza mínima del 85 %, y sólo se tiene en cuenta una única muestra de CrD_{95}).
- La concentración de indicador en la muestra que proporcione el resultado más bajo se obtiene interpolando 116,4 mg/kg con 95,1 mg/kg, o 118,3 mg/kg con 96,7 mg/kg, respectivamente.
- 8.3. Sitosterol
- 8.3.1. La proporción de incorporación de sitosterol es de 600 gramos de sitosterol de una pureza del 90 % por tonelada de mantequilla, es decir, 540 mg/kg.
- 8.3.2. Si se tiene en cuenta el CrD_{95} , la media de los tres resultados no será inferior a 514,4 mg/kg.
- 8.3.3. Además del criterio indicado en el punto 8.3.2, el resultado más bajo obtenido de los análisis del producto se emplea para comprobar la homogeneidad de la distribución del indicador. Este proceso se realiza mediante comparación con los siguientes límites:
- 485,1 mg/kg (el 95 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a sitosterol de una pureza mínima del 90 %, y sólo se tiene en cuenta una única muestra de CrD_{95});
 - 404,1 mg/kg (el 80 % de la proporción de incorporación mínima corresponde a sitosterol de una pureza mínima del 90 %, y sólo se tiene en cuenta una única muestra de CrD_{95}).
- La concentración de indicador en la muestra que proporcione el resultado más bajo se obtiene interpolando 485,1 mg/kg con 404,1 mg/kg.

Figura 1 Cromatograma de la mezcla para la prueba de resolución

Es preferible la resolución completa, es decir, la línea del pico del lanosterol debe volver a la línea de base antes de volver a subir para formar el pico del sitosterol, pero puede aceptarse la resolución incompleta.

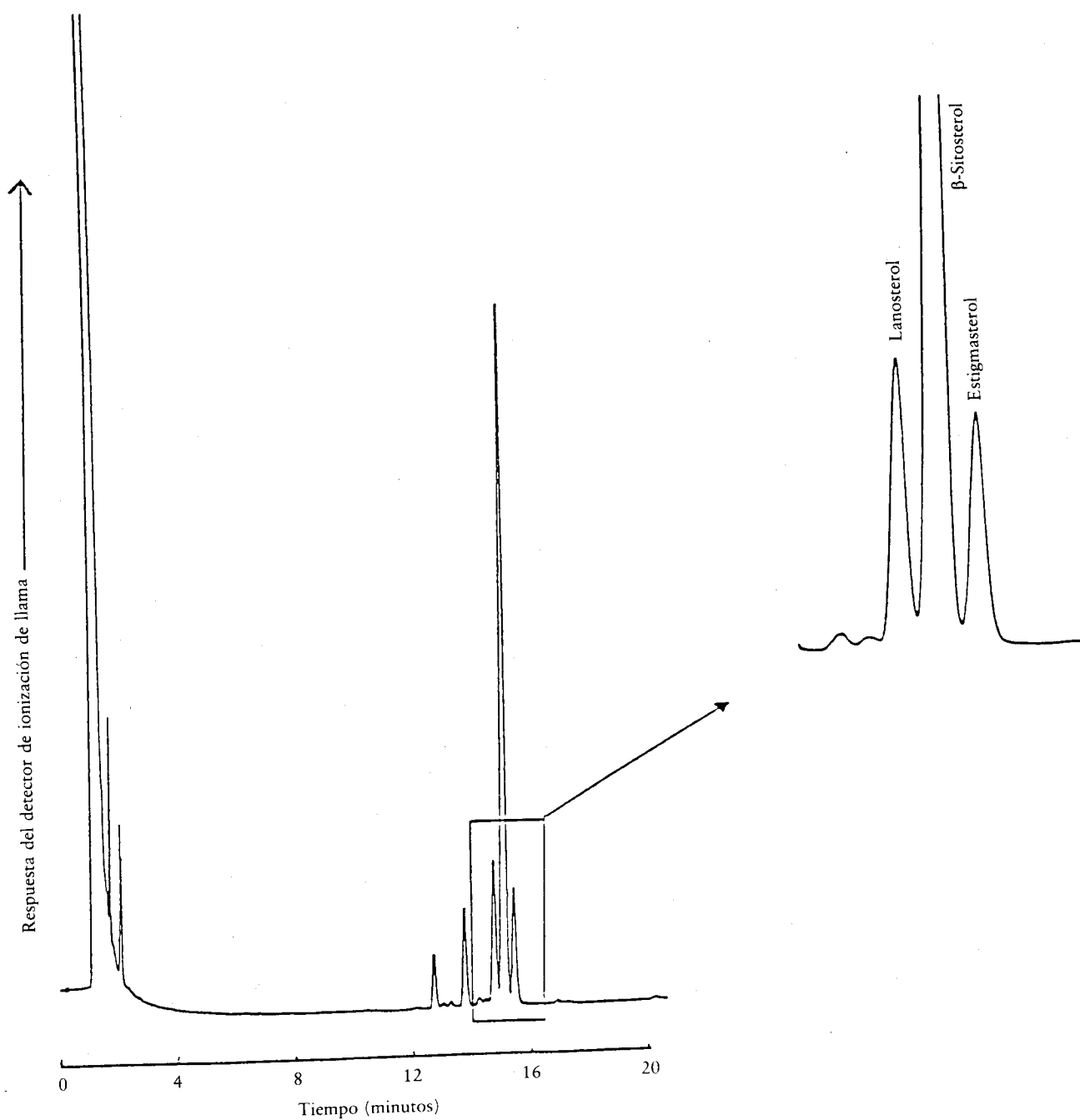


Figura 2a
Patrón de estigmasterol

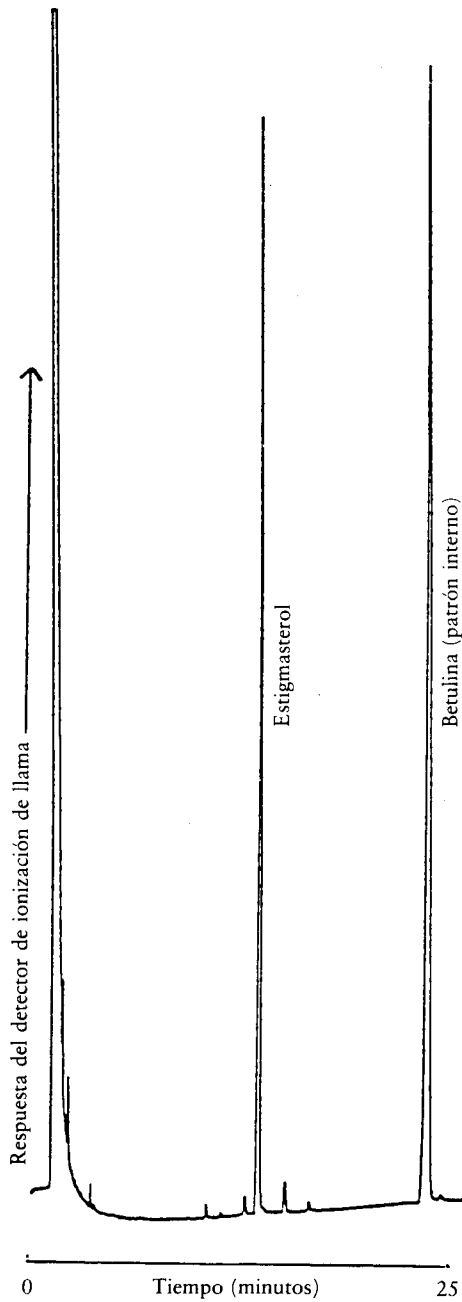
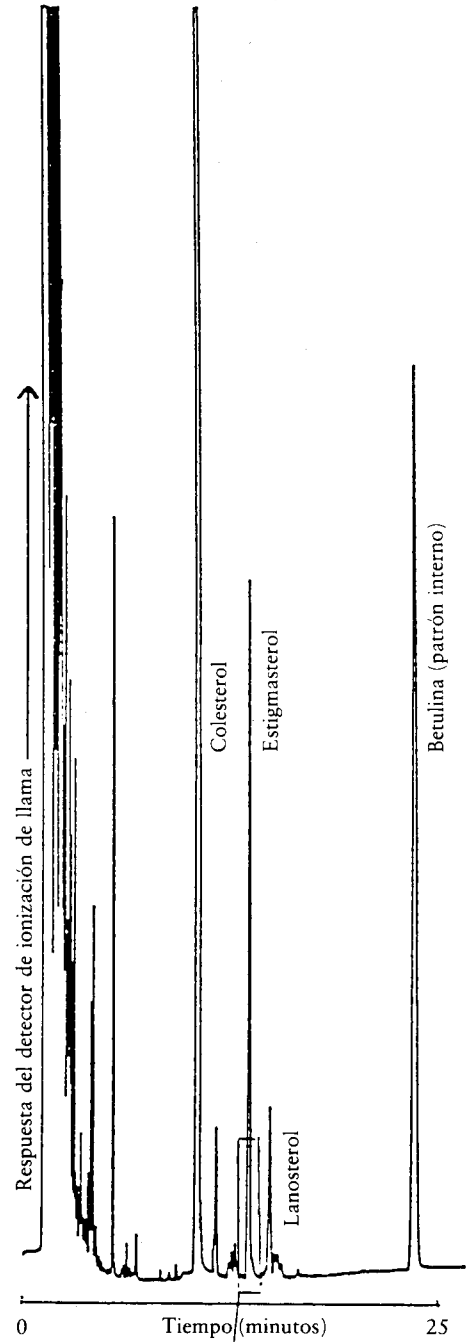


Figura 2b
Muestra de mantequilla
desnaturalizada con estigmasterol



Nota: La integración del pico del estigmasterol debe incluir las posibles colas, según se define con los puntos 1, 2 y 3.

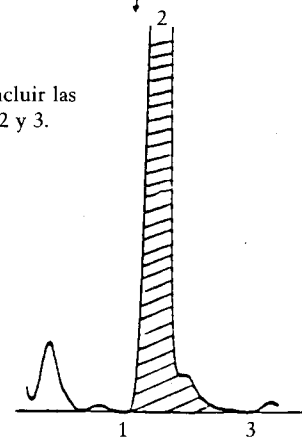


Figura 3a
Patrón de β -sitosterol

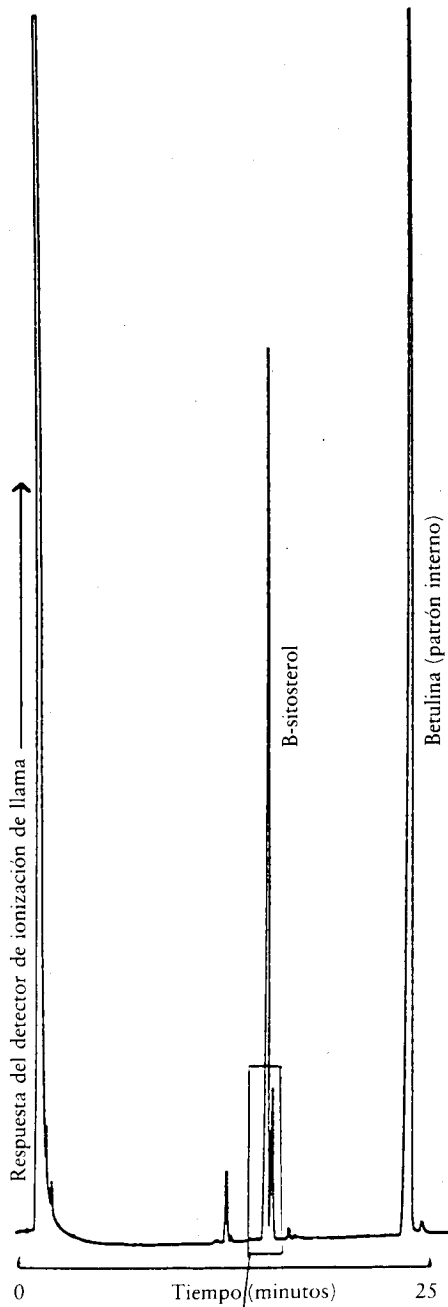
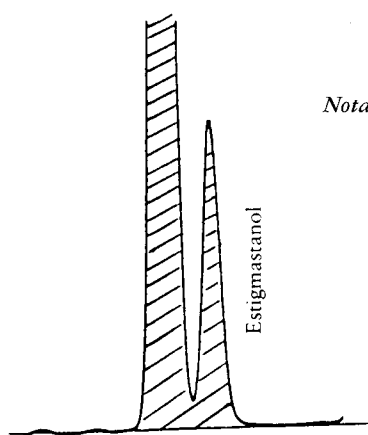
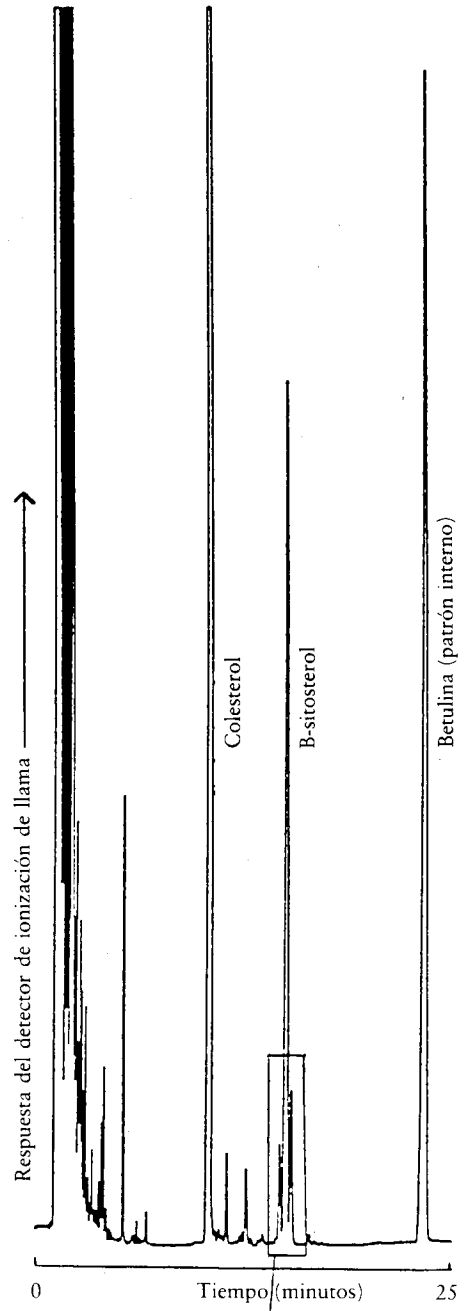


Figura 3b
Muestra de mantequilla
desnaturalizada con β -sitosterol



Nota: El β -sitosterol suele contener una impureza (identificada como estigmastanol) que eluye inmediatamente tras el β -sitosterol. Las áreas de estos dos picos deben sumarse para evaluar el contenido total en β -sitosterol.

