



MÉTHODE D'ANALYSE

DÉTERMINATION DES STIGMASTADIÈNES DANS LES HUILES VÉGÉTALES

1. OBJET

Détermination des stigmastadiènes dans les huiles végétales contenant de faibles concentrations en ces hydrocarbures, notamment dans les huiles d'olive vierges et dans l'huile de grignons d'olive brute.

2. DOMAINE D'APPLICATION

La présente norme est applicable à tout type d'huiles végétales, bien que les déterminations ne soient valables que pour des teneurs en ces hydrocarbures comprises entre 0,01 et 4,0 mg/kg. Cette méthode est tout spécialement indiquée pour détecter la présence d'huiles végétales raffinées (olive, grignons d'olive, tournesol, soja, palme, etc.) dans l'huile d'olive vierge, du fait que, contrairement aux huiles raffinées, les huiles d'olive vierges ne contiennent pas de stigmastadiènes.

3. PRINCIPE

Isolement de l'insaponifiable. Séparation de la fraction d'hydrocarbures de stérols par chromatographie sur colonne de gel de silice et analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

4. APPAREILLAGE

- 4.1. Ballons à fond plat de 250 ml avec réfrigérant à reflux.
- 4.2. Ampoules à décanter de 500 ml.
- 4.3. Ballons à fond rond de 100 ml.
- 4.4. Évaporateur rotatif.
- 4.5. Colonne en verre pour chromatographie (diamètre intérieur 1,5 cm et longueur 50 cm) avec robinet en Téflon, bouchée dans sa partie inférieure par un tampon en laine de verre. Préparation de la colonne de gel de silice: verser de l'hexane dans la colonne pour chromatographie jusqu'à près de 5 cm de hauteur, remplir de pâte de gel de silice dans l'hexane (15 g dans 40 ml) à l'aide de portions d'hexane. Laisser décanter et compléter la sédimentation en appliquant une légère vibration. Ajouter du sulfate de sodium anhydre jusqu'à 0,5 cm de hauteur. Eluer l'excès d'hexane.

- 4.6. Appareil de chromatographie en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un injecteur du type diviseur ou "on column" et d'un four programmable, précision +/-1 °C.
- 4.7. Colonnes capillaires de silice fondue pour chromatographie en phase gazeuse (diamètre intérieur 0,25 ou 0,32 mm et longueur 25 m), recouvertes intérieurement d'une phase de méthylsilicone à 5%, épaisseur du film 0,25 µm.

Note 1: D'autres colonnes à polarité similaire ou inférieure peuvent être utilisées.

- 4.8. Intégrateur-enregistreur permettant l'intégration selon le mode vallée-vallée.
- 4.9. Microseringue de 5-10 µl pour chromatographie en phase gazeuse avec aiguille cimentée.

5. **RÉACTIFS**

Sauf indication contraire, tous les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée devrait être de l'eau distillée ou de l'eau dont la pureté est au moins équivalente.

- 5.1. Hexane ou mélange d'alcane, intervalle du point d'ébullition à 65-70°C, distillé dans une colonne de rectification.

Note 2: L'hexane doit être distillé pour éliminer les impuretés.

- 5.2. Éthanol 96 v/v.
- 5.3. Sulfate de sodium anhydre.
- 5.4. Solution alcoolique d'hydroxyde de potassium à 10% p/v. Ajouter 10 ml d'eau à 50 g d'hydroxyde de potassium, agiter, puis diluer jusqu'à 500 ml avec de l'éthanol.

Note 3: La potasse alcoolique brunit avec le temps. Elle devrait être préparée de nouveau chaque jour et gardée dans des bouteilles de verre foncé bien bouchées.

- 5.5. Gel de silice 60 pour chromatographie sur colonne, 70-230 mesh (Merck, réf. 7734 ou similaire).

Note 4: Généralement, le gel de silice peut être utilisé directement à partir du récipient d'origine, sans aucun traitement. Toutefois, des lots de silice peuvent présenter une faible activité se traduisant par de mauvaises séparations chromatographiques. Dans de telles circonstances, le gel de silice doit faire l'objet du traitement suivant: désactiver le gel de silice en le chauffant pendant quatre heures au minimum à 550°C. Par la suite, introduire le gel de silice dans un dessiccateur et, après refroidissement, le transférer dans un ballon bouché. Ajouter 2 % d'eau et agiter pour assurer l'élimination complète des grumeaux et l'écoulement normal de la poudre.

Dans l'hypothèse de l'obtention de chromatogrammes avec des pics d'interférence, le gel de silice utilisé devrait faire l'objet du traitement indiqué ci-dessus. À titre d'alternative, on peut utiliser du gel de silice extra pur 60 (Merck, réf. 7754).

- 5.6. Solution concentrée (200 ppm) de cholesta-3,5-diène (Sigma, pureté 99%) dans l'hexane (10 mg dans 50 ml).
- 5.7. Solution étalon de cholesta-3,5-diène dans l'hexane à la concentration de 20 ppm, obtenue par dilution de la solution 5.6.

Note 5: Si elles sont conservées à une température inférieure à 4°C, les solutions 5.6 et 5.7 demeurent intactes pendant au moins 4 mois.

- 5.8. Gaz vecteur pour chromatographie: hélium ou hydrogène de qualité N-50.
- 5.9. Gaz auxiliaires pour le détecteur à ionisation de flamme: hydrogène de qualité N-50 et air épuré.
- 5.10. Solution de n-nonacosane dans l'hexane à la concentration d'environ 100 ppm.

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1. Préparation de l'insaponifiable:

6.1.1. Peser exactement $20 \pm 0,1$ g d'huile dans un ballon de 250 ml, ajouter 1 ml de la solution étalon de cholesta-3,5-diène (20 ug) et 75 ml de potasse alcoolique à 10 %, connecter au réfrigérant à reflux et chauffer jusqu'à légère ébullition pendant 30 minutes. Retirer le ballon contenant l'échantillon et laisser refroidir légèrement (si on laisse refroidir complètement, l'échantillon se solidifie). Ajouter 100 ml d'eau, puis transférer la solution dans une ampoule à décanter à l'aide de 100 ml d'hexane. Agiter énergiquement le mélange pendant 30 secondes et laisser décanter.

Note 6: S'il y a formation d'émulsions, attendre un instant, car elles disparaissent rapidement. En cas de persistance, ajouter de petites quantités d'éthanol.

6.1.2. Soutirer la phase aqueuse inférieure dans une deuxième ampoule à décanter et extraire de nouveau à l'aide de 100 ml d'hexane. Soutirer de nouveau la phase aqueuse inférieure et laver les extraits d'hexane (réunis dans une autre ampoule à décanter) à trois reprises chaque fois avec un mélange de 100 ml d'éthanol-eau (1:1) jusqu'à neutralité du pH.

6.1.3. Passer la solution d'hexane à travers le sulfate de sodium anhydre (50 g), laver avec 20 ml d'hexane, puis évaporer dans un évaporateur rotatif à 30°C sous pression réduite jusqu'à séchage.

6.2. Séparation de la fraction d'hydrocarbures de stérols:

6.2.1. Transférer le résidu dans la colonne de fractionnement à l'aide de deux portions de 1 ml d'hexane, introduire l'échantillon dans la colonne en veillant à ce que le niveau de la solution recouvre le sulfate de sodium. Commencer l'élution avec l'hexane au débit de 1 ml/min. environ. Éliminer la première élution de 25-30 ml, puis recueillir la fraction suivante de 40 ml.

Note 7: La première fraction contient des hydrocarbures saturés (cf. Figure 1a) et la deuxième comporte les hydrocarbures de stérols. Une élution ultérieure fournit les pics du squalène et de ses constituants. Une bonne séparation entre les hydrocarbures saturés et les hydrocarbures de stérols exige l'optimisation des volumes des fractions. Pour y aboutir, le volume de la première fraction devrait être ajusté de manière à assurer que les pics représentant les hydrocarbures saturés (cf. Figure 1c) soient bas au moment de l'analyse de la deuxième fraction; dans l'hypothèse où ces pics n'apparaîtraient pas, mais que l'intensité du pic de l'étalon interne est faible, le volume devrait être réduit. Néanmoins, une séparation complète entre les composants de la première et de la deuxième fraction n'est pas nécessaire, puisqu'il n'y a pas de chevauchement de pics pendant l'analyse par CPG. L'optimisation du volume de la deuxième fraction n'est généralement pas nécessaire, car il existe une bonne séparation entre les hydrocarbures de stérols et les composants élués ultérieurement. Toutefois, la présence d'un pic important à un temps de rétention inférieur d'environ 1,5 minute à celui de l'étalon interne est due au squalène et indique que la séparation n'est pas intervenue correctement.

6.2.2. Évaporer la deuxième fraction dans l'évaporateur rotatif à 30°C et sous pression réduite jusqu'à séchage. Dissoudre immédiatement le résidu dans 0,2 ml d'hexane. Garder la solution au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse.

Note 8: Les résidus 6.1.3 et 6.2.2 ne doivent demeurer ni secs ni à la température ambiante. Aussitôt après avoir été obtenus, ajouter le solvant, puis garder les solutions au réfrigérateur.

6.3. Chromatographie en phase gazeuse

6.3.1. Conditions opératoires:

- Température de l'injecteur: 300°C.
- Température de la colonne: 320°C.
- Intégrateur-enregistreur: les paramètres d'intégration des pics doivent être fixés de manière à obtenir une évaluation correcte des aires. Le mode d'intégration vallée-vallée est recommandé .
- Sensibilité instrumentale: environ 16 fois l'atténuation minimale.
- Quantité de solution injectée: 1 μ l.
- Programmation de la température du four: température initiale de 235°C pendant 6 minutes, puis augmentation à raison de 2°C/min. jusqu'à 285°C.
- Rapport de division: 1:15 avec injecteur du type diviseur.
- Gaz vecteur: hélium ou hydrogène à la pression de 120 kPa environ.

Les conditions opératoires peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de l'appareil de chromatographie et de la colonne, de façon à obtenir des chromatogrammes répondant aux conditions suivantes: pic de l'étalon interne 5 minutes par rapport aux temps de rétention indiqués sous 6.3.2; le pic de l'étalon interne devrait atteindre au moins 80% de l'échelle de l'enregistreur.

Le fonctionnement du système de chromatographie en phase gazeuse doit être vérifié en injectant un mélange de la solution concentrée de cholestadiène (5.6) et de n-nonacosane (5.10). Le pic du cholesta-3,5-diène doit apparaître avant celui du n-nonacosane (figure 1c);

s'il ne devait pas en être ainsi, on peut soit réduire la température initiale du four, soit remplacer la colonne de CPG par une colonne à polarité inférieure.

6.3.2. Identification des pics

Le pic de l'étalon interne apparaît au temps de rétention de 19 minutes environ et celui du stigmasta-3,5-diène au temps de rétention relatif de 1,29 (cf. figure 1b).

Le stigmasta-3,5-diène apparaît avec de petites quantités d'un isomère et les deux donnent généralement lieu à un seul pic chromatographique. Toutefois, si la colonne est trop polaire ou fait preuve d'un pouvoir de résolution élevé, l'isomère peut se présenter comme un petit pic et paraître avant et à proximité du pic du stigmasta-3,5-diène. Dans ce cas, les deux aires doivent être additionnées (cf. figure 2). Il est souhaitable d'éliminer le stigmastadiène fractionné et de remplacer la colonne par une colonne à polarité inférieure ou ayant un diamètre intérieur supérieur.

Note 9: Les stigmastadiènes de référence peuvent être obtenus en appliquant la méthode pour la détermination des hydrocarbures de stérols sur une huile végétale raffinée. Les stigmastadiènes présentent en effet un pic significatif et facilement repérable sur le chromatogramme.

Note 10: Veiller à éviter tout chevauchement de l'étalon interne et des stigmastadiènes avec les pics qui apparaissent lors de l'élution de la première fraction par chromatographie sur colonne de gel de silice.

6.3.3. Analyse quantitative

La teneur en stigmastadiènes est déterminée d'après la formule suivante:

$$\text{mg/kg de stigmastadiènes} = \frac{A_s \times M_C}{A_C \times M_O}$$

où: A_s = aire du pic des stigmastadiènes (si le pic est fractionné, additionner les aires des deux isomères).

A_C = aire de l'étalon interne (cholestadiène).

M_C = masse, en microgrammes, de l'étalon interne ajouté.

M_O = masse, en grammes, de la prise d'essai d'huile.

Limite de détection: environ 0,01 mg/kg.

Note 11: Lorsque le chromatogramme fait apparaître une teneur en stigmastadiènes supérieure à 4 mg/kg, leur dosage, si requis, doit être effectué en appliquant la méthode pour la détermination des hydrocarbures de stérols.

Figure 1. Chromatogrammes obtenus à partir d'échantillons d'huile d'olive analysés sur colonne capillaire de silice fondue (diamètre intérieur 0,25 mm, longueur 25 m) recouverte intérieurement de phénylméthylsilicone à 5%, épaisseur du film 0,25 μ m.

- a) Première fraction (30 ml) issue d'une huile d'olive vierge, additionnée de cholestadiène.
- b) Deuxième fraction (40 ml) issue d'une huile d'olive contenant 0,10 mg/kg de stigmastadiènes.
- c) Deuxième fraction (40 ml) contenant une petite portion de la première fraction.

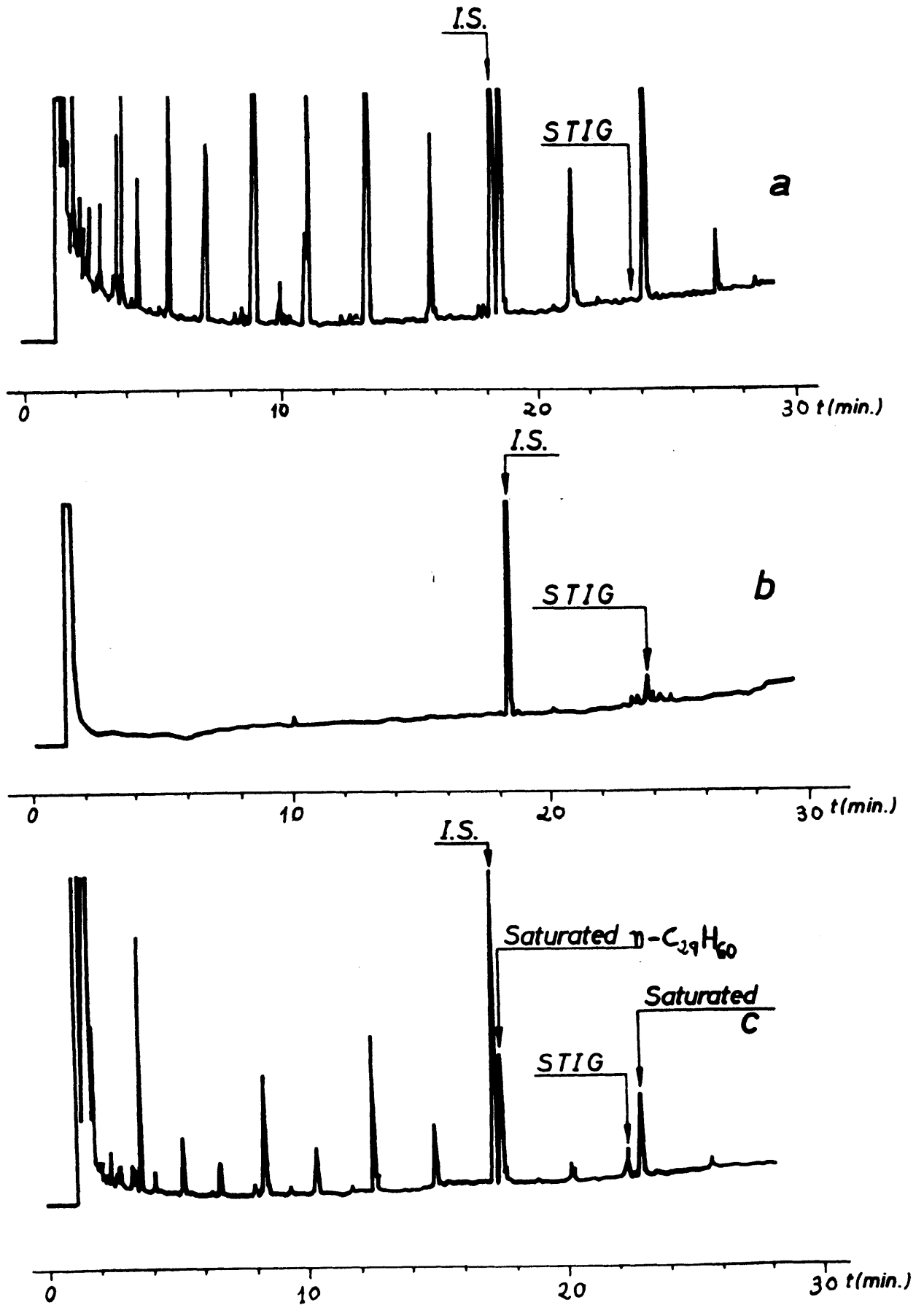


Figure 1

Figure 2. Chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon d'huile d'olive raffinée analysé sur colonne DB-5, montrant l'isomère du stigmasta-3,5-diène.

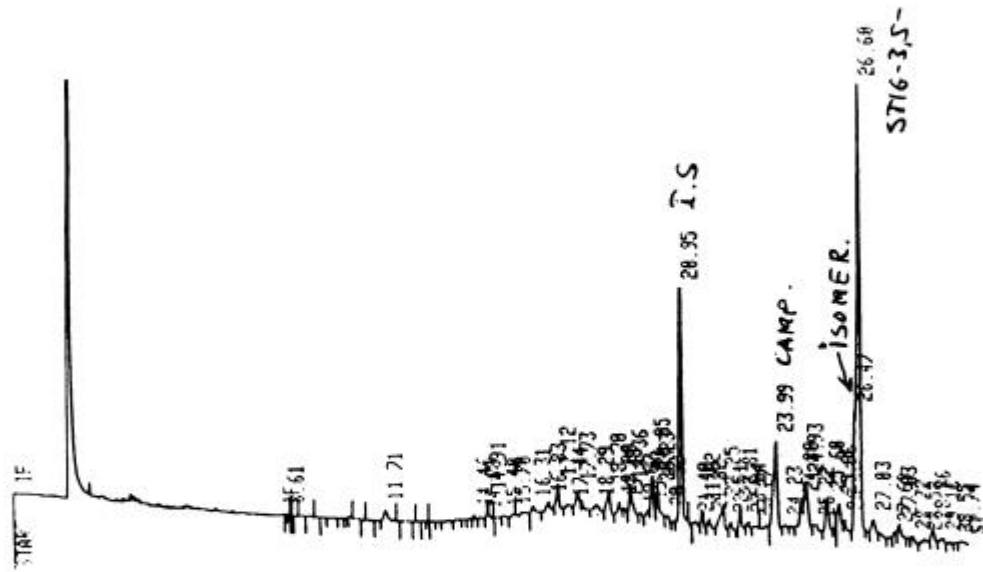


Figure 2

MARGES DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE

1. Analyse des résultats de l'essai collaboratif

Les marges de précision de la méthode figurent dans le tableau ci-après.

L'essai collaboratif proposé par le Secrétariat exécutif en 1999 aux laboratoires agréés par le Conseil Oléicole International à cette date, a été réalisé par 19 laboratoires de 8 pays.

L'essai a porté sur cinq échantillons:

- A: huile d'olive vierge extra
- B: huile d'olive vierge + huile de tournesol raffinée
- C: huile d'olive vierge + huile de grignons d'olive raffinée
- D: huile d'olive vierge + huile de soja raffinée + huile de tournesol raffinée
- E: huile d'olive raffinée + huile de grignons d'olive raffinée + huile de soja raffinée + huile d'olive vierge lampante.

L'analyse statistique des résultats de l'essai collaboratif réalisée par le Secrétariat exécutif du Conseil Oléicole International a suivi les règles établies dans les normes ISO 5725 **Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure**; l'examen des valeurs aberrantes a été réalisé par l'application du test de Cochran et du test de Grubbs sur les résultats des laboratoires pour chaque détermination (réplicats a et b) et chaque échantillon.

Le tableau fait état des informations suivantes :

n	Nombre de laboratoires ayant pris part à l'essai
outliers	Nombre de laboratoires aux résultats aberrants
mean	Moyenne des résultats acceptés
r	Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95 % , la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus en appliquant la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans le même laboratoire avec le même opérateur utilisant le même appareillage et pendant un court intervalle de temps
S_r	Écart-type de répétabilité
RSD_r (%)	Coefficient de variation de répétabilité (S _r x 100 / mean)

- R** Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels obtenus en appliquant la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans des laboratoires différents, avec des opérateurs différents utilisant un appareillage différent
- S_R** Écart-type de reproductibilité
- RSD_R (%)** Coefficient de variation de reproductibilité ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Teneur en stigmastadiènes (ppm)

	A	B	C	D	E
n	19	19	19	19	19
outliers	3	5	7	2	5
mean	0.01	0.80	9.49	0.22	7.55
r	0.01	0.08	0.39	0.05	0.48
S_r	0.004	0.03	0.14	0.01	0.17
RSD_r (%)	32.43 _(not sig.)	3.70	1.5	8.41	2.29
R	0.033	0.15	1.66	0.06	1.59
S_R	0.012	0.05	0.59	0.025	0.57
RSD_R (%)	98.59 _(not sig.)	6.73	6.26	11.45	7.55

2. Bibliographie

ISO 5725-1:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 1: Principes généraux et définitions

ISO 5725-2: 1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-5: 1998 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 5: Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-6:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 6: Utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude