



## **MÉTHODE D'ANALYSE**

### **DÉTERMINATION DES STIGMASTADIÈNES** **DANS LES HUILES VÉGÉTALES**

#### **1. OBJET**

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

#### **2. CHAMP D'APPLICATION**

La norme peut être appliquée à toutes les huiles végétales, mais les déterminations ne sont fiables que lorsque la teneur en ces hydrocarbures se situe entre 0,01 et 4,0 mg/kg. La méthode est particulièrement adaptée pour détecter la présence d'huiles végétales raffinées (olive, grignons d'olive, tournesol, soja, palme, etc.) dans l'huile d'olive vierge, car les huiles raffinées contiennent des stigmastadiènes et les huiles vierges n'en contiennent pas.

#### **3. PRINCIPE**

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

Les stigmastadiènes peuvent être analysés en utilisant soit la méthode de référence de la partie A, soit la méthode simplifiée de la partie B. Les deux méthodes partagent le même principe, mais la méthode simplifiée utilise une quantité réduite d'échantillon, de réactifs et de solvants. En cas de litige, les résultats obtenus au moyen de la méthode de référence doivent prévaloir.

## PARTIE A : MÉTHODE DE RÉFÉRENCE

### A. 4. APPAREILLAGE

- A.4.1. Flacons à fond plat de 250 mL avec condenseur à reflux.
- A. 4.2 Ampoules à décanter d'une capacité de 500 mL.
- A.4.3. Flacons à fond rond de 100 mL.
- A. 4.4. Évaporateur rotatif.
- A. 4.5. Colonne de chromatographie en verre (1,5 cm de diamètre intérieur sur 50 cm de longueur) avec un robinet en téflon et un tampon de laine de verre au fond. Pour préparer la colonne de gel de silice, verser l'hexane dans la colonne de chromatographie jusqu'à une hauteur d'environ 5 cm, puis remplir avec une suspension de gel de silice dans l'hexane (15 g dans 40 mL) à l'aide de portions d'hexane. Laisser reposer et terminer la décantation en appliquant une légère vibration. Ajouter du sulfate de sodium anhydre jusqu'à une hauteur de 0,5 cm, puis éluer l'hexane en excès.
- A. 4.6. Chromatographe en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme, injecteur *split* ou sur colonne et four programmable à  $\pm 1$  °C près.
- A. 4.7. Colonnes capillaires en silice fondue pour la chromatographie en phase gazeuse (0,25 ou 0,32 mm de diamètre intérieur sur 25 m de longueur) revêtues d'une phase de phénylméthylsilicone à 5%, épaisseur de film de 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Note 1: D'autres colonnes de polarité similaire ou inférieure peuvent être utilisées.
- A. 4.8. Intégrateur-enregistreur avec possibilité de mode d'intégration vallée-vallée.
- A.4.9. Microseringue de 5-10  $\mu\text{L}$  pour chromatographie en phase gazeuse avec aiguillecimentée.

### A. 5. RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique, sauf indication contraire. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée, ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

- A. 5.1. Hexane ou mélange d'alcane d'intervalle de p.b. de 65-70 °C, distillé avec colonne de rectification. (L'hexane peut être remplacé par de l'isooctane (2,2,4-triméthyl pentane en qualité chromatographique), à condition que des valeurs de précision comparables soient obtenues (voir Valeurs de précision de la méthode avec utilisation d'isooctane), le résidu après évaporation de 100 mL de solvant peut être contrôlé. Les solvants dont le point d'ébullition est supérieur à celui du n-hexane mettent plus de temps à s'évaporer, mais ils sont préférés en raison de la toxicité de l'hexane).

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

- A. 5.2. Éthanol à 96 % V/V.
- A. 5.3. Sulfate de sodium anhydre.
- A. 5.4. Solution alcoolique d'hydroxyde de potassium à 10% m/V. Ajouter 10 mL d'eau à 50 g d'hydroxyde de potassium, remuer, puis dissoudre le mélange dans de l'éthanol jusqu'à 500 mL.

Note 3 : La potasse alcoolique devient brune avec le stockage. Elle doit être préparée chaque jour et conservée dans des bouteilles en verre foncé bien bouchées.

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

Note 4: En règle générale, le gel de silice peut être utilisé directement à partir du récipient d'origine sans aucun traitement. Toutefois, certains lots de silice peuvent présenter une faible activité, ce qui entraîne de mauvaises séparations chromatographiques. Dans ces circonstances, le gel de silice doit être traité de la manière suivante : Désactiver le gel de silice en le chauffant pendant au moins 4 h à 550 °C. Après le chauffage, placer le gel de silice dans un dessiccateur pendant que le gel refroidit, puis transférer le gel de silice dans un flacon bouché. Ajouter 2% d'eau et agiter jusqu'à ce qu'il n'y ait plus aucun grumeau et que la poudre s'écoule librement.

Si les lots de gel de silice donnent lieu à des chromatogrammes avec des pics interférents, le gel de silice doit être traité comme ci-dessus. On peut aussi utiliser du gel de silice extra pur 60 (Merck, réf. 7754).

- A. 5.6. Solution mère (200 mg/L) de cholesta-3,5-diène (Sigma, pureté de 99%) dans de l'hexane (10 mg dans 50 mL).
- A. 5.7. Solution étalon de cholesta-3,5-diène dans l'hexane à une concentration de 20 mg/L, obtenue par dilution de la solution ci-dessus.

Note 5. Si elles sont maintenues à une température inférieure à 4 °C, les solutions 5.6 et 5.7 ne se détérioreront pas pendant une période d'au moins 4 mois.

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

## **A. 6. PROCÉDURE**

- A. 6.1. Préparation des insaponifiables :

A. 6.1.1. Peser  $20 \pm 0,1$  g d'huile dans un ballon de 250 mL, ajouter 1 mL de la solution étalon de cholesta-3,5-diène (20 $\mu$ g) et 75 mL de potasse alcoolique à 10%, installer un condenseur à reflux et chauffer jusqu'à légère ébullition pendant 30 min. Retirer le flacon contenant l'échantillon du feu et laisser la solution refroidir légèrement (ne pas laisser refroidir complètement car l'échantillon va prendre). Ajouter 100 mL d'eau et transférer la solution dans une ampoule à décanter à l'aide de 100 mL d'hexane. Agiter vigoureusement le mélange pendant 30 s et le laisser se stratifier.

Note 6. Si une émulsion s'est produite, attendre qu'elle disparaisse rapidement ou ajouter de petites quantités d'éthanol.

A. 6.1.2. Transférer la phase aqueuse inférieure dans une deuxième ampoule à décanter et extraire à nouveau avec 100 mL d'hexane. Faire couler à nouveau la phase inférieure et laver les extraits d'hexane (combinés dans une autre ampoule à décanter) trois fois avec 100 mL à chaque fois d'un mélange éthanol-eau (1:1, V/V) jusqu'à ce que le pH neutre soit atteint.

A. 6.1.3. Faire passer la solution d'hexane dans du sulfate de sodium anhydre (50 g), la laver avec 20 mL d'hexane et l'évaporer dans un évaporateur rotatif à 30 °C et à basse pression jusqu'à ce qu'elle soit sèche.

A. 6.2 Séparation de la fraction d'hydrocarbures stéroïdiens :

A. 6.2.1. Amener le résidu dans la colonne de fractionnement à l'aide de deux portions de 1 mL d'hexane, faire passer l'échantillon sur la colonne en laissant le niveau de la solution descendre jusqu'au sommet du sulfate de sodium et commencer l'élution chromatographique avec de l'hexane à un débit de 1 mL/min. environ. Jeter les 25-30 premiers mL de l'élution et recueillir ensuite la fraction suivante de 40 mL.

Note 7. La première fraction contient des hydrocarbures saturés (**Figure 1a**) et la deuxième fraction des stéroïdes. L'élution ultérieure fournit du squalène et des composés apparentés. Pour obtenir une bonne séparation entre les hydrocarbures saturés et les hydrocarbures stéroïdiens, il est nécessaire d'optimiser les volumes des fractions. À cet effet, le volume de la première fraction doit être ajusté de manière à ce que, lors de l'analyse de la seconde fraction, les pics représentant les hydrocarbures saturés soient bas (voir **Figure 1c**) ; s'ils n'apparaissent pas mais que l'intensité du pic standard est faible, le volume doit être réduit. De toute façon, une séparation complète entre les composants des première et deuxième fractions est inutile, car il n'y a pas de chevauchement des pics lors de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. L'optimisation du volume de la seconde fraction n'est généralement pas nécessaire car une bonne séparation existe avec les autres composants. Néanmoins, la présence d'un pic élevé à un temps de rétention inférieur d'environ 1,5 min à celui de l'étalon est due au squalène, et elle est le signe d'une mauvaise séparation.

A. 6.2.2. Évaporer la deuxième fraction dans un évaporateur à 30 °C et à basse pression jusqu'à ce qu'elle soit sèche, et dissoudre immédiatement le résidu dans 0,2 mL d'hexane. Conserver la solution au réfrigérateur jusqu'à l'analyse.

Note 8. Les résidus A. 6.1.3. et A. 6.2.2. ne doivent pas être conservés au sec et à température

ambiante. Dès qu'ils sont obtenus, le solvant doit être ajouté et les solutions doivent être conservées au réfrigérateur.

### A. 6.3. Chromatographie en phase gazeuse

#### A. 6.3.1. Conditions de travail :

- Température de l'injecteur : 300 °C.
- Température du détecteur : 320 °C.
- Intégrateur-enregistreur : Les paramètres d'intégration doivent être fixés de manière à donner une évaluation correcte des aires.  
Le mode d'intégration vallée-vallée est recommandé.
- Sensibilité : Environ 16 fois l'atténuation minimale.
- Quantité de solution injectée : 1 µL.
- Températures de programmation du four : Au départ 235 °C pendant 6 min puis en augmentant de 2 °C/min jusqu'à 285 °C.
- Injecteur avec diviseur de débit 1:15.
- Gaz vecteur : hélium ou hydrogène à une pression d'environ 120 kPa.

Ces conditions peuvent être ajustées en fonction des caractéristiques du chromatographe et de la colonne pour donner des chromatogrammes répondant aux exigences suivantes : pic de l'étalon interne dans un délai d'environ 5 minutes par rapport au temps indiqué au point A. 6.3.2 ; le pic de l'étalon interne doit être au moins à 80 % de la pleine échelle.

Le système de chromatographie en phase gazeuse doit être vérifié en injectant un mélange de la solution mère de cholestadiène (A. 5.6) et de la solution de n-nonacosane (A. 5.10). Le pic de cholesta-3,5-diène doit apparaître avant le n-nonacosane (**Figure 1c**) ; si cela ne se produit pas, deux mesures peuvent être prises : abaisser la température initiale du four ou remplacer la colonne GC par une colonne moins polaire.

#### A. 6.3.2. Identification des pics

Le pic de l'étalon interne apparaît à environ 19 min. et le stigmasta-3,5-diène à un temps de rétention relatif de 1,29 (voir Figure 1b).

Le stigmasta-3,5-diène va avec de petites quantités d'un isomère, et généralement les deux donnent lieu à un seul pic chromatographique. Néanmoins, si la colonne est trop polaire ou présente un grand pouvoir de résolution, l'isomère peut apparaître comme un petit pic avant et à côté de celui du stigmasta-3,5-diène. Dans ce cas, les deux surfaces doivent être additionnées (**Figure 2**). Il est conseillé d'éliminer la division du stigmastadiène en remplaçant la colonne par une colonne moins polaire ou d'un diamètre intérieur supérieur.

Note 9. Les stigmastadiènes de référence peuvent être obtenus à partir de l'analyse d'une huile végétale raffinée au moyen de la méthode de détermination des hydrocarbures stéroïdiens. Les stigmastadiènes donnent naissance à un pic significatif et facilement identifiable.

Note 10. Il faut veiller à ce qu'il n'y ait pas de chevauchement entre l'étalon interne et les

stigmastadiènes avec l'un des pics qui apparaissent dans la première fraction éluée de la colonne de gel de silice.

#### A.6.3.3. Analyse quantitative

La teneur en stigmastadiènes est déterminée selon la formule :

$$\text{mg/kg de stigmastadiènes} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

où :

$A_s$  = aire du pic des stigmastadiènes (si le pic est divisé, somme des aires des deux isomères)

$A_c$  = aire de l'étalon interne (cholestadiène)

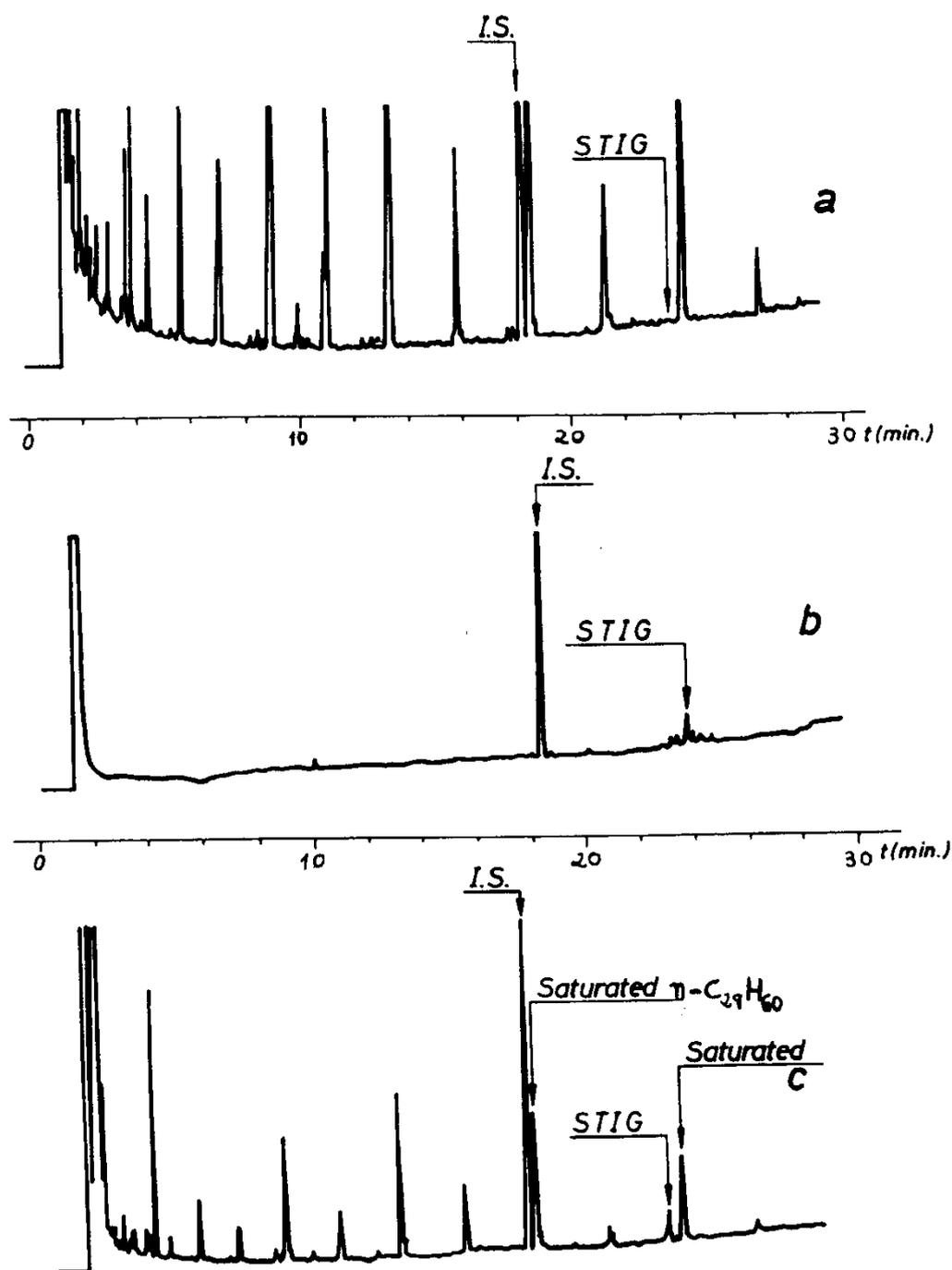
$M_c$  = masse de l'étalon ajouté, en microgrammes

$M_o$  = masse d'huile prélevée, en grammes.

Le résultat est exprimé avec deux décimales.

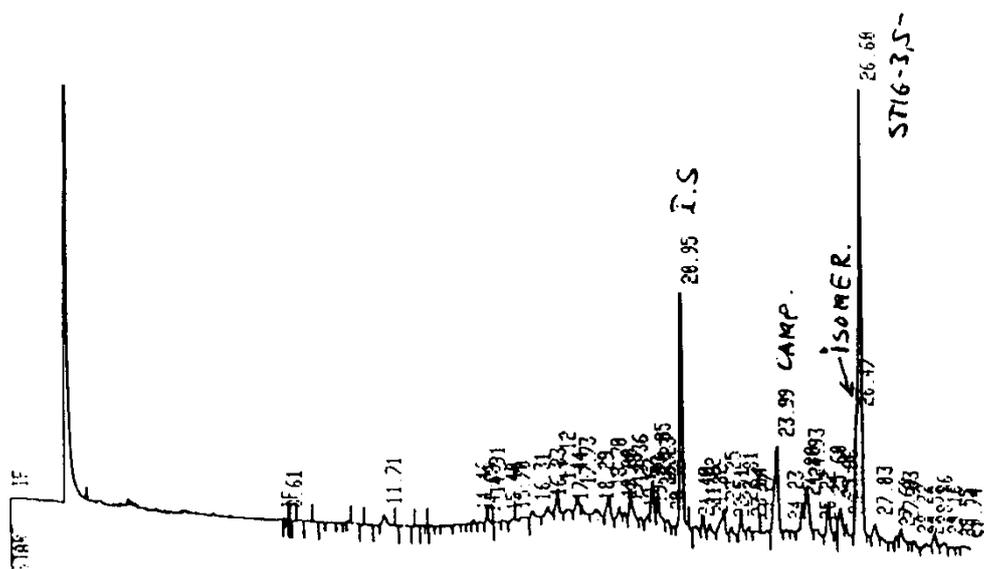
Limite de détection : environ 0,01 mg/kg.

Note 11. Lorsque les stigmastadiènes apparaissent en concentrations supérieures à 4 mg/kg, si une quantification est nécessaire, la méthode de détermination des stérènes dans l'huile raffinée doit être appliquée.



**Figure 1.** Chromatogrammes en phase gazeuse obtenus à partir d'échantillons d'huile d'olive analysés sur une colonne capillaire en silice fondue (0,25 mm de diamètre intérieur sur 25 m) revêtue de silicone à 5% de phénylméthyle, d'une épaisseur de 0,25 $\mu$ m.

- (a) Première fraction (30 mL) d'une huile vierge, dopée à l'étalon.
- (b) Deuxième fraction (40 mL) provenant d'une huile d'olive contenant 0,10 mg/kg de stigmastadiènes.
- (c) Deuxième fraction (40 mL) contenant une faible proportion de la première fraction.



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

## PARTIE B : MÉTHODE ALTERNATIVE

### B.4. APPAREILLAGE

- B. 4.1. Flacons de 50 mL pouvant être utilisés avec un condenseur à reflux.
  - B. 4.2. Colonne de verre pour chromatographie liquide, diamètre intérieur 10 mm, longueur 20-40 cm, munie d'un robinet d'arrêt approprié.
  - B. 4.3. Chromatographe en phase gazeuse utilisable avec une colonne capillaire comportant les parties suivantes :
    - B. 4.3.1. Four à thermostat avec programmation de la température.
    - B. 4.3.2. Injecteur: un des deux injecteurs suivants :
      - B. 4.3.2.1. Injecteur à froid pour l'injection directe sur la colonne
      - B.4.3.2.1. Injecteur évaporateur S/SL fonctionnant en mode "splitless" avec un temps de fermeture de 1 min à une température de 300 °C
    - B. 4.3.3. Détecteur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur.
    - B. 4.3.4. Système d'acquisition informatisé ou enregistreur-intégrateur destiné à être utilisé avec l'amplificateur convertisseur (B. 3.3.3), avec un temps de réponse ne dépassant pas 1 s et une vitesse de papier variable.
    - B. 4.3.5. Colonne capillaire
- Colonnes capillaires en silice fondue pour la chromatographie en phase gazeuse (0,25 ou 0,32 mm de diamètre intérieur sur 25-30 m de longueur) revêtues d'une phase de phénylméthylsilossane à 5 %, épaisseur de film de 0,10-0,25  $\mu\text{m}^1$ .
- B. 4.4. Microseringue, 10  $\mu\text{L}$ , pour injection directe sur la colonne.
  - B. 4.5. Microseringue, 10  $\mu\text{L}$ , pour injection à travers un septum en silicone.
  - B. 4.6. Chauffe-ballon ou plaque chauffante électrique.
  - B. 4.7. Évaporateur rotatif.
  - B. 4.8. Four à moufle.
  - B. 4.9. Balance analytique pour peser avec une précision de  $\pm 0,1$  mg.

---

<sup>1</sup> Des phases liquides commerciales appropriées sont disponibles à cette fin, telles que SE52, SE54, DB-5, etc.

- B. 4.10. Microseringue, 100 µL, pour l'ajout d'un étalon interne.
- B. 4.11. Ampoule à décanter équipée d'un robinet d'arrêt approprié.
- B. 4.12. Verrerie de laboratoire habituelle.

## **B.5. RÉACTIFS**

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique, sauf indication contraire. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée, ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

- B. 5.1. Gel de silice, 60-200 mesh. Placer le gel de silice dans le four à moufle à 550 °C pendant au moins 4 h. Laisser refroidir, transférer dans un erlenmeyer muni d'un bouchon en verre rodé et ajouter ensuite 2% d'eau par rapport à la quantité de gel de silice utilisée. Bien agiter, de préférence avec un agitateur rotatif pour homogénéiser la bouillie et attendre au moins 12 h avant l'utilisation.
- B. 5.2. Solvant d'extraction et d'élution. L'un des trois solvants alternatifs suivants peut être utilisé.
  - B. 5.2.1. n-hexane, pour chromatographie (ou analyse des résidus) : la pureté doit être vérifiée. Évaporer 50 mL d'n-hexane, dissoudre le résidu dans 100 µL et analyser les conditions chromatographiques de la méthode. Il ne doit y avoir aucun pic dans l'aire d'intérêt du chromatogramme.

*AVERTISSEMENT - Les fumées peuvent s'enflammer. Tenir à l'écart des sources de chaleur, des étincelles ou des flammes nues. S'assurer que les bouteilles sont toujours correctement fermées. Les vapeurs peuvent provoquer une somnolence ou des vertiges. Veiller à une bonne ventilation pendant l'utilisation. Éviter l'accumulation de vapeurs et supprimer tout risque d'incendie, comme les chauffages ou les appareils électriques qui ne sont pas fabriqués à partir de matériaux ininflammables. Perturbateur en cas d'inhalation, car il peut provoquer des lésions des cellules nerveuses. Éviter d'inhaler les fumées. Utiliser un appareil respiratoire approprié si nécessaire. Éviter tout contact avec les yeux et la peau.*

- B. 5.2.2. n-heptane, de qualité chromatographique, la pureté doit être vérifiée : évaporer 50 mL de solvant et dissoudre le résidu dans 100 µL et analyser les conditions chromatographiques de la méthode .Il ne doit y avoir aucun pic dans l'aire d'intérêt du chromatogramme.

*AVERTISSEMENT - Les fumées peuvent s'enflammer. Tenir à l'écart des sources de chaleur, des étincelles ou des flammes nues. S'assurer que les bouteilles sont toujours correctement fermées. Les vapeurs peuvent provoquer une somnolence ou des vertiges. Veiller à une bonne ventilation pendant l'utilisation. Éviter l'accumulation de vapeurs et supprimer tout risque d'incendie, comme les chauffages ou les appareils électriques qui ne sont pas fabriqués à partir de matériaux ininflammables.*

- B. 5.2.3. Iso-octane (2,2,4-triméthylpentane), de qualité chromatographique, la pureté doit être vérifiée : évaporer 50 mL de solvant et dissoudre le résidu dans 100 µL et

analyser les conditions chromatographiques de la méthode. Il ne doit y avoir aucun pic dans l'aire d'intérêt du chromatogramme.

*AVERTISSEMENT - Les fumées peuvent s'enflammer. Tenir à l'écart des sources de chaleur, des étincelles ou des flammes nues. S'assurer que les bouteilles sont toujours correctement fermées. Les vapeurs peuvent provoquer une somnolence ou des vertiges. Veiller à une bonne ventilation pendant l'utilisation. Éviter l'accumulation de vapeurs et supprimer tout risque d'incendie, comme les chauffages ou les appareils électriques qui ne sont pas fabriqués à partir de matériaux ininflammables. Éviter tout contact avec la peau et les yeux. Éviter l'inhalation de vapeurs ou de gouttelettes.*

B. 5.3. Granulés d'hydroxyde de potassium 85% min.

*AVERTISSEMENT – Attention : Très corrosif. Après inhalation, déplacer le patient dans un endroit aéré et appeler un médecin. Après contact avec la peau, laver abondamment à l'eau et retirer les vêtements contaminés. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment à l'eau et consulter un spécialiste des yeux. Éviter tout contact avec les yeux et la peau.*

B. 5.4. Éthanol à 96 % V/V

*AVERTISSEMENT - Inflammable. Tenir à l'écart des oxydants, de la chaleur et des flammes. Tenir à l'écart de la chaleur, des étincelles et des flammes nues. Éviter les déversements, le contact avec la peau et les yeux. Bien ventiler pour éviter de respirer les vapeurs.*

B. 5.5. Sulfate de sodium anhydre

B. 5.7. Cholesta-3,5-diène Pureté > 93% (es. Sigma cod. C6012)

B. 5.7.1. Solution mère (200 ppm) de cholesta-3,5-diène (Sigma > 93%) dans le solvant d'élution (B. 5.2) (10 mg dans 50 mL).

B. 5.7.2. Solution étalon de travail (20 ppm) de cholesta-3,5-diène dans le solvant d'élution (B. 5.2), obtenue par dilution de la solution indiquée ci-dessus<sup>2</sup>.

B. 5.8. Solution de n-nonacosane dans un solvant d'extraction à une concentration d'environ 100 ppm.

B. 5.9. Hydroxyde de potassium, environ 2 mol/L de solution éthanolique. Dissoudre 130 g d'hydroxyde de potassium en refroidissant dans 200 mL d'eau distillée, puis compléter à un litre avec de l'éthanol. Conserver la solution dans des bouteilles en verre foncé bien bouchées.<sup>3</sup>

B. 5.10. Gaz vecteur : hydrogène ou hélium, pur, qualité chromatographie en phase gazeuse.

---

<sup>2</sup> Les solutions B. 5.7.1 et B. 5.7.2 sont stables pendant une période d'au moins quatre mois si elles sont maintenues à une température inférieure à 4 °C.

<sup>3</sup> La potasse alcoolique devient brune avec le stockage. Elle doit être préparée chaque jour et conservée dans des bouteilles en verre foncé bien bouchées

*AVERTISSEMENT - Hydrogène - Hautement inflammable, sous pression. Tenir à l'écart des sources de chaleur, des étincelles, des flammes nues ou des appareils électriques non fabriqués en matériaux ininflammables. Veiller à ce que le robinet de la bouteille soit fermé lorsqu'elle n'est pas utilisée. Toujours utiliser avec un réducteur de pression. Relâcher la tension du ressort du réducteur avant d'ouvrir le robinet de la bouteille. Se tenir éloigné de l'ouverture de la bouteille au moment d'ouvrir le robinet. Veiller à une bonne ventilation pendant l'utilisation. Ne pas transférer l'hydrogène d'une bouteille à l'autre. Ne pas mélanger de gaz dans la bouteille. Veiller à ce que les bouteilles ne puissent pas être renversées. Les tenir à l'écart de la lumière du soleil et des sources de chaleur. Stocker dans un environnement non corrosif. Ne pas utiliser de bouteilles endommagées ou non étiquetées.*

*Hélium. - Gaz comprimé à haute pression. Il réduit la quantité d'oxygène disponible pour la respiration. Maintenir la bouteille fermée. Veiller à une bonne ventilation pendant l'utilisation. Ne pas entrer dans les zones de stockage si elles ne sont pas correctement ventilées. Toujours utiliser avec un réducteur de pression. Relâcher la tension du ressort du réducteur avant d'ouvrir le robinet de la bouteille. Ne pas transférer le gaz d'une bouteille à l'autre. Veiller à ce que les bouteilles ne puissent pas être renversées. Se tenir éloigné de l'ouverture de la bouteille au moment d'ouvrir le robinet. Maintenir à l'écart de la lumière du soleil et des sources de chaleur. Conserver dans un environnement non corrosif. Ne pas utiliser de bouteilles endommagées ou non étiquetées. Ne pas inhaler. N'utiliser qu'à des fins techniques.*

#### B. 5.11. Gaz auxiliaires :

- Hydrogène, pur, qualité chromatographie en phase gazeuse.
- Air, pur, qualité chromatographie en phase gazeuse.

#### *AVERTISSEMENT*

*Air. - Gaz comprimé à haute pression. À utiliser avec précaution en présence de substances combustibles, car la température d'auto-inflammation de la plupart des composés organiques présents dans l'air est considérablement plus basse sous haute pression. Veiller à ce que le robinet de la bouteille soit fermé lorsqu'elle n'est pas utilisée. Utiliser toujours un réducteur de pression. Relâcher la tension du ressort du réducteur avant d'ouvrir le robinet de la bouteille. Se tenir éloigné de l'ouverture de la bouteille au moment d'ouvrir le robinet. Ne pas transférer de gaz d'une bouteille à l'autre. Ne pas mélanger le gaz dans la bouteille. Veiller à ce que les bouteilles ne puissent pas être renversées. Maintenir à l'écart de la lumière du soleil et des sources de chaleur. Conserver dans un environnement non corrosif. Ne pas utiliser de bouteilles endommagées ou non étiquetées. L'air destiné à des fins techniques ne doit pas être utilisé pour l'inhalation ou les appareils respiratoires.*

### **B.6. PROCÉDURE**

#### B.6.1. Préparation de la colonne de chromatographie

B. 6.1.1. Mettre en suspension 5 g de gel de silice (B. 5.1) dans le solvant d'élution (B. 5.2) et l'introduire dans la colonne (B. 4.2). Laisser décanter spontanément. Terminer la décantation à l'aide d'un agitateur électrique pour rendre le lit chromatographique plus homogène. Percoler 10 mL du solvant d'élution (B. 5.2) pour éliminer les

impuretés

B. 6.1.2. Préparation des insaponifiables :

B. 6.1.3. Peser  $2,0 \pm 0,1$  g d'huile dans un ballon à fond rond de 50 mL et ajouter, à l'aide d'une seringue en verre, 100  $\mu$ L de la solution étalon de travail de cholesta-3,5-diène (B. 5.7.2) et 10 mL de potasse alcoolique à 2 mol/L. Ajuster le réfrigérant à reflux et chauffer jusqu'à légère ébullition pendant 30 min. Retirer le flacon contenant l'échantillon de la chaleur et laisser la solution refroidir légèrement. Ajouter 20 mL d'eau et verser la solution dans une ampoule à décanter à l'aide de 20 mL de solvant d'extraction. Agiter vigoureusement le mélange pendant 30 s et le laisser se stratifier.

Jeter la couche aqueuse. Laver deux fois le solvant d'extraction avec 50 mL d'un mélange éthanol-eau (1:1) jusqu'à ce que le pH soit neutre (éliminer la phase de lavage). Si une émulsion s'est produite, attendre qu'elle disparaisse rapidement ou ajouter de petites quantités d'éthanol.

B. 6.1.4. Faire passer la solution de solvant d'extraction à travers du sulfate de sodium anhydre (20 g), laver avec 20 mL de solvant d'extraction et évaporer dans un évaporateur rotatif à 30 °C et à basse pression jusqu'à ce qu'elle soit sèche.

B. 6.2. Séparation de la fraction d'hydrocarbures stéroïdiens :

B. 6.2.1. Amener le résidu dans la colonne de fractionnement à l'aide de deux portions de 1 mL de solvant d'extraction, puis faire passer l'échantillon sur la colonne.

Laisser le solvant s'écouler à 1 mm au-dessus du niveau supérieur de l'absorbant, puis faire percoler  $10 \pm 5$  mL de solvant d'extraction afin d'éluer les n-alcanes naturels<sup>4</sup>.

Ensuite, percoler encore  $10 \pm 5$  mL d'hexane et le recueillir dans un tube à essai (cette fraction contient les stérènes)<sup>5</sup>.

Régler le débit de manière à avoir environ 15 gouttes toutes les 10 s. Toutes les opérations doivent être effectuées à température ambiante (inférieure à 28 °C).

Évaporer la fraction de stigmastadiène avec l'évaporateur rotatif ou dans un bloc sec chauffé à l'aide d'un léger rinçage à l'azote et la dissoudre dans 50-100  $\mu$ L de solvant d'élution (B. 5.2).

---

<sup>4</sup> En général, l'élution avec 10 mL produit une séparation efficace, mais pour assurer une bonne séparation des hydrocarbures saturés et stéroïdiens, le volume de chaque fraction doit être soigneusement optimisé car en cas de co-élution des hydrocarbures saturés avec les stigmastadiènes, de faux résultats peuvent être obtenus. Il est recommandé de calibrer le volume d'élution en utilisant une solution de nonacosane - cholesta-3,5-diène et en mesurant les volumes d'élution qui donnent la meilleure séparation des deux composants.

<sup>5</sup> Si un pic élevé apparaît à un temps de rétention inférieur d'environ 1,5 min à la norme, cela est dû au squalène et est signe d'une mauvaise séparation.

## B.7. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

### B.7.1. Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales sont généralement les suivantes :

- Température de la colonne :  

20 °C/min	5 °C/min	
80 °C au début (1')	200 °C	260 °C (20)
—————→	—————→	
- Température du détecteur: 300 °C.
- Quantité injectée: 1-2 µL de solution B. 5.2 (50-100 µL)
- Gaz vecteur : hélium ou hydrogène à la vitesse linéaire optimale pour le gaz choisi.
- Sensibilité de l'instrument: suffisante pour atteindre une limite de détection d'environ 0,01 mg/kg pour le stigmastadiène.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et du chromatographe en phase gazeuse, afin d'obtenir une élution sans chevauchement des stigmastadiènes

### B.7.2. Analyse chromatographique

Prendre 1 µL de la solution à l'aide de la micro-seringue de 10 µL, en tirant sur le piston jusqu'à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille dans le système d'injection et injecter rapidement après 1 à 2 s. Après environ 5 s, extraire doucement l'aiguille.

Effectuer l'enregistrement jusqu'à élution complète des stigmastadiènes.

Le système de chromatographie en phase gazeuse doit être vérifié en injectant un mélange de la solution mère de cholestadiène et de la solution de n-nonacosane. Les deux pics doivent être entièrement résolus. Si ce n'est pas le cas, modifier le programme de température ou utiliser une colonne avec une polarité différente.

### B.7.3. Identification des pics

Identifier les pics des temps de rétention en comparant le chromatogramme obtenu avec un chromatogramme de référence obtenu à partir de l'analyse d'une huile végétale raffinée<sup>5</sup>.

### B.7.4. Analyse quantitative.

---

<sup>5</sup> Les chromatogrammes obtenus de l'analyse d'une huile d'olive raffinée ou d'une huile de grignons d'olive produisent généralement un pic de stigmastadiène prédominant et facilement identifiable.

Déterminer les aires des pics correspondant à l'étalon interne de cholesta-3,5-diène et des stigmastadiènes :

$$\text{mg/kg de stigmastadiènes} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

où :

$A_s$  = aire correspondant au pic des stigmastadiènes, en comptage informatique

$A_c$  = aire correspondant à l'étalon interne (cholesta,3-5,diene) dans les comptages informatiques

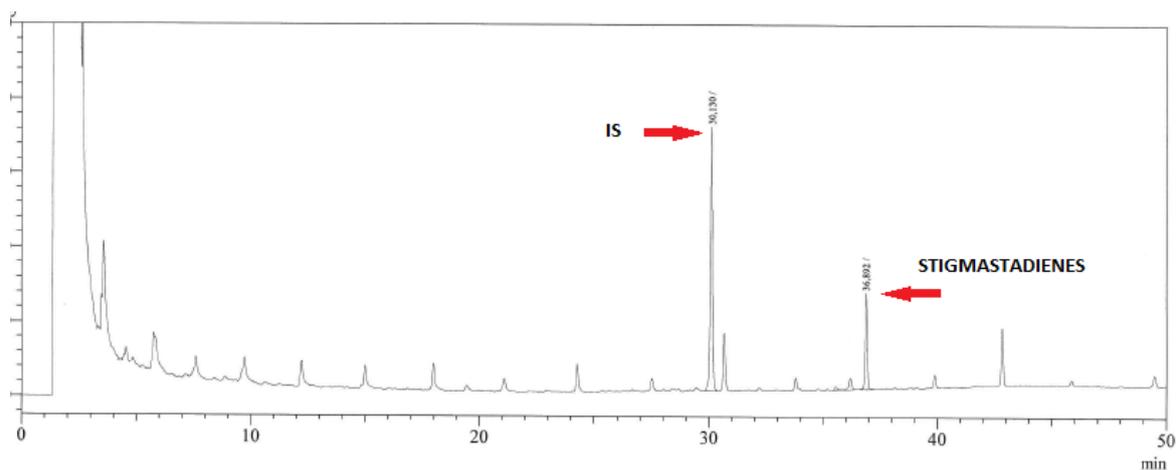
$M_c$  = masse de l'étalon en  $\mu\text{g}$

$M_o$  = masse de l'échantillon, en grammes.

## B. 8. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Indiquer la teneur en stigmastadiènes en mg/kg.

Les résultats doivent être exprimés avec deux décimales jusqu'à 0,99 mg/kg ; les concentrations supérieures à 1,0 mg/kg doivent être exprimées avec une décimale.



**Figure 3.** Chromatogramme en phase gazeuse d'une huile d'olive vierge contenant 5% d'huile d'olive raffinée analysée au moyen de la méthode B.

## VALEURS DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE

### 1. Analyse des résultats des essais collaboratifs

Les valeurs de précision de la méthode sont indiquées dans le tableau au verso.

Dix-neuf laboratoires agréés par le COI à l'époque ont participé à l'essai collaboratif organisé par le Secrétariat exécutif en 1999. Ces laboratoires étaient issus de huit pays.

L'essai a été effectué sur cinq échantillons :

- A: huile d'olive extra vierge
- 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

Les résultats de l'essai collaboratif organisé par le Secrétariat exécutif du COI ont été traités statistiquement selon les règles établies dans les normes internationales ISO 5725 **Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure**. Les valeurs aberrantes ont été examinées en appliquant le test de Cochran et Grubbs aux résultats de laboratoire pour chaque détermination (répliques a et b) et chaque échantillon.

Le tableau indique :

<b>n</b>	Nombre de laboratoires participants
<b>outliers</b>	Nombre de laboratoires présentant des valeurs aberrantes
<b>moyenne</b>	Moyenne des résultats acceptés
<b>r</b>	Valeur au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps
<b>S<sub>r</sub></b>	Écart type de répétabilité
<b>RDS<sub>r</sub> (%)</b>	Coefficient de variation de la répétabilité ( $S_r \times 100/\text{moyenne}$ )
<b>R</b>	Valeur au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.
<b>S<sub>R</sub></b>	Écart-type de reproductibilité
<b>RDS<sub>R</sub> (%)</b>	Coefficient de variation de la reproductibilité ( $S_R \times 100/\text{moyenne}$ )

**Teneur en stigmastadiènes (mg/kg)**

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>n</b>	19	19	19	19	19
<b>valeurs aberrantes</b>	3	5	7	2	5
<b>moyenne</b>	0,01	0,80	9,49	0,22	7,55
<b>r</b>	0,01	0,08	0,39	0,05	0,48
<b>S<sub>r</sub></b>	0,00	0,03	0,14	0,01	0,17
<b>RSD<sub>r</sub>(%)</b>	32,4 (non sig.)	3,7	1,5	8,4	2,3
<b>R</b>	0,03	0,15	1,66	0,06	1,59
<b>S<sub>R</sub></b>	0,01	0,05	0,59	0,03	0,57
<b>RSD<sub>R</sub>(%)</b>	98,6 (non sig.)	6,7	6,3	11,5	7,6

**2. Analyse des résultats de l'essai collaboratif du COI en 2017 pour l'essai de compétence**

Seul un échantillon d'huile d'olive vierge ayant une teneur quantifiable en stigmastadiènes, adultérée avec 10% d'huile d'olive raffinée et 2% de graisse animale a été testé.

<b>Stigmastadiènes (mg/kg)</b>	<b>n</b>	<b>Moyenne consensus</b>	<b>S<sub>r</sub></b>	<b>S<sub>R</sub></b>
<b>Méthode de référence</b>	25	15,70	0,38	1,08
<b>Méthode alternative au solvant</b>	24	15,45	0,26	1,06
<b>Évaluation</b>	<b>Calculé</b>	<b>Limite</b>	<b>Conclusion/Commentaires</b>	
<b>Différence (Méthode de référence - Méthode alternative au solvant)</b>	0,25			
<b>Répétabilité essai F</b>	2,16	2,04	Bien que le F calculé soit supérieur au F limite, le S <sub>r</sub> obtenu avec le solvant alternatif est plus petit et améliore les résultats	
<b>Reproductibilité essai F</b>	1,04	2,04	F cal < F limite	
<b>Reproductibilité actuelle de référence</b>	1,1	1,3	Le R <sub>s</sub> obtenu est inférieur au R <sub>s</sub> actuel	
<b>T Student</b>	0,81	2	t cal < t limite	

Où la Méthode de référence est la méthode de la partie A qui utilise l'hexane comme solvant;

Où la Méthode alternative est la méthode de la partie B avec l'isooctane comme solvant.

La comparaison des résultats a porté sur l'évaluation comparative des écarts, tant dans des conditions de reproductibilité, que sur l'existence d'un biais significatif ou non parmi les valeurs attribuées après application de la méthode de référence et celles obtenues après

utilisation du solvant alternatif.

À cet effet, le F Fisher des deux variances obtenues, dans les deux conditions, ainsi que le TStudent des deux populations étudiées, qui compare les deux moyennes obtenues et leurs variances respectives, dans des conditions de reproductibilité, ont été calculés.

La valeur de précision actuellement publiée pour le niveau étudié a également été comparée, et celle obtenue avec l'utilisation de solvants alternatifs.

### **3. Analyse des résultats des essais collaboratifs du COI en 2020 pour la comparaison des méthodes A et B.**

Dix-huit laboratoires ont participé à l'essai collaboratif organisé par le Secrétariat exécutif en 2020. Les laboratoires étaient issus de neuf pays.

L'essai a été effectué en utilisant la méthode de référence de la partie A et la méthode alternative simplifiée de la partie B sur un ensemble de cinq échantillons :

- A : huile d'olive vierge non modifiée
- B : mélange d'huile d'olive vierge + huile d'olive raffinée (environ 1%)
- C : mélange d'huile d'olive vierge + huile d'olive raffinée (environ 5%)
- D : huile d'olive vierge + huile de grignons raffinée
- E : mélange d'huile d'olive vierge + huile de tournesol raffinée (environ 10%)

**PARTIE A : MÉTHODE DE RÉFÉRENCE**

<b>ÉCHANTILLON</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>N</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>17</b>
<b>Outliers</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>Moyenne</b>	<b>0,016</b>	<b>0,075</b>	<b>0,29</b>	<b>1,062</b>	<b>3,156</b>
<b>Médiane</b>	<b>0,018</b>	<b>0,077</b>	<b>0,290</b>	<b>1,056</b>	<b>3,151</b>
<b>Sr</b>	<b>0,003</b>	<b>0,004</b>	<b>0,010</b>	<b>0,024</b>	<b>0,066</b>
<b>SR</b>	<b>0,008</b>	<b>0,008</b>	<b>0,019</b>	<b>0,058</b>	<b>0,147</b>
<b>Cv r %</b>	<b>20,0%</b>	<b>5,7%</b>	<b>3,5%</b>	<b>2,2%</b>	<b>2,1%</b>
<b>Cv R %</b>	<b>46,9%</b>	<b>10,8%</b>	<b>6,6%</b>	<b>5,5%</b>	<b>4,6%</b>

**PARTIE B : MÉTHODE ALTERNATIVE**

<b>ÉCHANTILLON</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>N</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>17</b>
<b>Outliers</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>Moyenne</b>	<b>0,018</b>	<b>0,072</b>	<b>0,278</b>	<b>0,944</b>	<b>3,212</b>
<b>Médiane</b>	<b>0,020</b>	<b>0,075</b>	<b>0,289</b>	<b>1,047</b>	<b>3,168</b>
<b>Sr</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,007</b>	<b>0,014</b>	<b>0,032</b>	<b>0,095</b>
<b>SR</b>	<b>0,0075</b>	<b>0,021</b>	<b>0,044</b>	<b>0,156</b>	<b>0,200</b>
<b>Cv r %</b>	<b>15,0%</b>	<b>10,1%</b>	<b>4,9%</b>	<b>3,4%</b>	<b>3,0%</b>
<b>Cv R %</b>	<b>41,7%</b>	<b>28,8%</b>	<b>16,0%</b>	<b>16,5%</b>	<b>6,2%</b>

**Références normatives**

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

ISO 5725-2 : 2019 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 : 1994 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