

METHODE POUR LA DETERMINATION DES STERENES DANS LES HUILES VEGETALES RAFFINEES

1. OBJET

Détermination des stérènes (campestadiènes et stigmastadiènes), hydrocarbures dérivés des stérols pendant les traitements de raffinage ou de déstérolisation appliqués aux huiles végétales.

2. DOMAINE D'APPLICATION

La présente norme peut être employée pour détecter la présence d'huiles de graines déstérolisées dans l'huile d'olive raffinée, dans l'huile de grignons d'olive raffinée et dans les mélanges de ces huiles avec de l'huile d'olive vierge. La méthode peut être utilisée également pour le dosage des stigmastadiènes dans les huiles dont la teneur en ces substances est supérieure à 4 mg/kg.

3. PRINCIPE

Isolement de la fraction d'hydrocarbures de stérols par chromatographie sur colonne de gel de silice imprégné de nitrate d'argent et analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

4. APPAREILLAGE

- 4.1 Ballons à fond rond de 100 ml.
- 4.2 Ballons à fond rond de 500 ml.
- 4.3 Erlenmeyer de 25 ml.
- 4.4 Dessiccateur contenant du gel de silice activé.
- 4.5 Evaporateur rotatif.

- 4.6 Colonne en verre pour chromatographie (diamètre intérieur 1,5-2,0 cm et longueur 50 cm) avec robinet en Téflon, bouchée dans sa partie inférieure par un tampon en laine de verre ou plaque en verre fritté. Préparation de la colonne de gel de silice: verser de l'hexane dans la colonne jusqu'à près de 5 cm de hauteur, remplir de pâte de gel de silice argenté (5.5) dans l'hexane (20 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 près de 0,5 cm de hauteur, puis éluer l'excès d'hexane.
- 4.7 Appareil de chromatographie en phase gazeuse, équipé avec un détecteur à ionisation de flamme, un injecteur du type diviseur (ou "on-column" froid) et un four programmable, précision $\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 4.8 Colonne capillaire de silice fondue pour chromatographie en phase gazeuse (diamètre intérieur 0,25 mm et longueur 25 m) recouverte intérieurement d'une phase de phénylméthylsilicone à 5%, épaisseur du film 0,25 μm .

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

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

5. REACTIFS

A moins d'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.

Pour vérifier la pureté des réactifs, effectuer un essai à blanc.

- 5.1 Hexane ou mélange d'alcane, intervalle du point d'ébullition à 65-70°C, distillé dans une colonne de rectification.
- 5.2 Nitrate d'argent.
- 5.3 Sulfate de sodium anhydre.
- 5.4 Gel de silice 60 pour chromatographie sur colonne, 70-230 mesh (Merck réf. 7734 ou similaire), chauffé dans le four à 110°C pendant deux heures ou plus, puis refroidi dans le dessiccateur (4.4).

5.5 Préparation du gel de silice argenté pour deux colonnes.

Dans un ballon à fond rond de 500 ml (4.2), peser 30 g de gel de silice activé (5.4). Dans un erlenmeyer de 25 ml (4.3), dissoudre 3,0 g de nitrate d'argent dans 7 ml d'eau distillée; puis, à l'aide d'une pipette, verser goutte à goutte la solution sur le gel de silice, en agitant de temps en temps. Boucher le ballon et agiter vigoureusement pendant 20 secondes, placer le ballon dans l'évaporateur rotatif et laisser tourner pendant 30 minutes à la pression atmosphérique et à la température ambiante. Le gel de silice vire légèrement au gris et peut être maintenu à l'obscurité dans le ballon bouché.

5.6 Solution tampon (200 ppm) de cholesta-3,5-diène (Sigma) 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 2. Si conservées à une température inférieure à 4°C, les solutions 5.6 et 5.7 demeurent inchangées pendant une période de 4 mois au minimum.

5.8 Solution de n-nonacosane dans l'hexane à la concentration d'environ 100 ppm.

5.9 Gaz vecteur pour chromatographie: hélium ou hydrogène, pureté 99,9990%.

5.10 Gaz auxiliaires pour le détecteur à ionisation de flamme: hydrogène (pureté 99,9990% et air épuré).

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Séparation de la fraction des hydrocarbures de stérols

6.1.1 Peser $1 \pm 0,01$ g d'huile dans un bécher de 10 ml, ajouter 1 ml de la solution étalon de cholesta-3,5-diène (20 μ g), transférer le mélange à 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.

6.1.2 Commencer l'élution chromatographique avec l'hexane au débit d'environ 1 ml/min. Eliminer la première élution de 40 ml, puis recueillir la fraction suivante de 60 ml et, séparément, la fraction successive de 20 ml.

Note 3. L'optimisation des volumes de la première et de la deuxième fraction peut être assurée en examinant les chromatogrammes obtenus de chaque fraction. La première fraction doit contenir des hydrocarbures saturés et ne contient pas de cholestadiène; la deuxième fraction doit montrer les hydrocarbures de stérols qui ne sont pas saturés et la troisième fraction ne devrait pas contenir de stérènes (**Figure 1**).

Note 4. A la fin du processus chromatographique, la colonne devrait être vidangée et le gel de silice argenté déshydraté devrait être versé dans un récipient et conservé en vue du recyclage de l'argent.

6.1.3 Transférer la deuxième fraction dans un ballon à fond rond de 100 ml (4.1) et évaporer dans un évaporateur rotatif à 30°C 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 5. Le résidu (6.1.3) ne doit pas être conservé à la température ambiante. Aussitôt après avoir été obtenu, il faut ajouter le solvant, puis garder les solutions au réfrigérateur.

6.2 Chromatographie en phase gazeuse

6.2.1 Conditions opératoires pour l'injecteur type diviseur

- Température de l'injecteur: 300°C.
- Température du détecteur: 320°C.
- 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 de l'injecteur type diviseur: 1:15.
- Quantité de solution injectée: 2 µl.
- Sensibilité: au moins 16 fois l'atténuation minimale.
- Gaz vecteur: hélium ou hydrogène à environ 120 et 80 kPa de pression, respectivement.
- Intégrateur-enregistreur. Les paramètres d'intégration doivent être fixés de manière à assurer une évaluation correcte des aires.

Ces conditions doivent être modifiées en fonction des caractéristiques de l'appareil de chromatographie et de la colonne, de façon à obtenir des chromatogrammes satisfaisant aux conditions suivantes: le pic de l'étalon interne doit apparaître au bout de ± 3 minutes par rapport au temps de rétention indiqué sous 6.2.2; le pic de l'étalon interne doit 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 tampon de cholesta-3,5-diène (5.6) et de la solution de n-nonacosane (5.8). Le pic résolu du cholesta-3,5-diène doit apparaître avant celui du n-nonacosane (**Figure 2**); s'il ne devait pas en être ainsi, on peut agir de deux façons: modifier la température du four et/ou utiliser une colonne à polarité inférieure. Dans ces conditions, il n'y a pas d'interférence entre les pics des hydrocarbures saturés et les pics des stérènes (**Figure 2**).

6.2.2 Identification des pics

En utilisant l'hélium comme gaz vecteur, 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 1,28 environ (Figure 1b). Le pic du campesta-3,5-diène apparaît au temps de rétention de 1,15 environ par rapport à l'étalon interne et de 0,90 environ par rapport au stigmasta-3,5-diène.

En utilisant l'hydrogène comme gaz vecteur, le pic de l'étalon interne apparaît au temps de rétention de 15 minutes environ et celui du stigmasta-3,5-diène au temps de rétention relatif de 1,33 environ. Le pic du campesta-3,5-diène apparaît au temps de rétention de 1,18 environ par rapport à l'étalon interne et de 0,88 environ par rapport au stigmasta-3,5-diène.

Le campesta-3,5-diène et le stigmasta-3,5,diène peuvent apparaître avec de petites quantités des isomères 2,4 respectifs. D'habitude, ces isomères ne donnent pas lieu à une élution séparée et se présentent donc comme un seul pic chromatographique. Toutefois, si la colonne est trop polaire ou fait preuve d'un pouvoir de résolution élevé, les isomères 2,4 peuvent se présenter comme un petit pic et apparaître avant et à proximité du pic des isomères 3,5 respectifs (**Figure 3**). Dans le souci d'assurer l'élution en un seul pic des stigmastadiènes, il est recommandé de remplacer la colonne par une colonne à polarité inférieure ou ayant un diamètre intérieur majeur.

Note 6. Les références chromatographiques de ces hydrocarbures de stérols peuvent être obtenues en analysant des échantillons d'huile de palme ou de tournesol raffinée ou d'huile de tournesol chauffée avec 10% v/p d'acide sulfurique:eau (1:1) à 150°C pendant 5 minutes.

6.2.3 Analyse quantitative

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

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

où: A_s = aire du pic des stigmastadiènes.

A_c = aire de l'étalon interne.

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

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

Les rapports entre les hydrocarbures sont calculés comme suit:

$$R1 = \frac{\text{aire du pic des stigmastadiènes}}{\text{aire du pic des campestadiènes}}$$

D'habitude, chaque paire d'isomères donne un seul pic chromatographique; toutefois, si les deux isomères sont à l'origine de deux pics différents, les deux aires doivent être additionnées.

Pour que ces rapports soient valables, la hauteur du pic des stigmastadiènes doit atteindre au moins 50% de l'échelle de l'enregistreur.

Note 7. Si la quantité de stigmastadiènes est supérieure à 50 ppm, l'analyse doit être répétée sur un échantillon d'huile plus petit, afin d'obtenir une quantification plus exacte.

Figure 1. Chromatogrammes des première et deuxième fractions obtenus à partir d'échantillons analysés sur colonne capillaire (diamètre intérieur 0,25 mm, longueur 25 m) revêtue intérieurement d'une phase de phénylméthylsilicone à 5% (épaisseur du film 0,25 μm), en utilisant l'hélium comme gaz vecteur.

- a) Première fraction d'un échantillon d'huile d'olive.
- b) Deuxième fraction d'un échantillon d'huile d'arachide.

Figure 2. Chromatogramme (1ère + 2ème fraction) obtenu à partir d'un mélange d'huile d'olive raffinée et d'huile de tournesol déstérolisée, analysé sur colonne capillaire (diamètre intérieur 0,25 mm, longueur 25 m) revêtue intérieurement d'une phase de phénylméthylsilicone à 5% (épaisseur du film 0,25 µm), en utilisant l'hélium comme gaz vecteur.

Figure 3. Chromatogramme de la deuxième fraction de l'échantillon d'huile de palme, analysé sur colonne polaire (phase de phénylméthylsilicone à 65%) montrant les isomères des stérènes.

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 ($S_r \times 100 / \text{mean}$)

- 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 ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Rapport stérène R1

	A	B	C	D	E
n			18		19
outliers			5		7
mean			19.96		15.86
r			1.67		1.25
S_r			0.59		0.45
RSD_r (%)			3.00		2.84
R			4.38		3.04
S_R			1.56		1.08
RSD_R(%)			7.85		6.86

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