



MÉTHODE D'ANALYSE

DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION ET DE LA TENEUR EN STÉROLS, EN DIALCOOLS TRITERPÉNIQUES ET ALCOOLS ALIPHATIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE

1. OBJET

La méthode décrit le procédé de détermination de la teneur individuelle et totale en composés alcooliques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive, ainsi que du mélange de ces deux huiles. Les composés alcooliques dans les huiles d'olive et les huiles de grignons d'olive comprennent les alcools aliphatiques, les stérols et les dialcools triterpéniques.

2. PRINCIPE

Les huiles, additionnées d' α -cholestanol et de 1-eicosanol comme étalon interne (I.S.), sont saponifiées avec de l'hydroxyde de potassium en solution éthanolique, puis la matière insaponifiable est extraite avec de l'éther éthylique.

Les fractions des différents composés alcooliques sont séparées de l'extrait insaponifiable par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice basique (méthode de référence) ou par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec une colonne de gel de silice. La fraction récupérée de la séparation du gel de silice est transformée en triméthylsilyléthers et analysée par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

PREMIÈRE PARTIE : PRÉPARATION DE LA MATIÈRE INSAPONIFIABLE

1. OBJET

Cette section décrit la préparation et l'extraction de la matière insaponifiable des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive.

2. PRINCIPE

Une prise d'essai est saponifiée en portant à ébullition sous reflux avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium. La matière insaponifiable est extraite avec de l'éther diéthylique.

3. APPAREILLAGE

- 3.1. Ballon de 250 mL muni d'un réfrigérant à reflux avec embouts rodés.
- 3.2. Ampoule à décanter de 500 mL.
- 3.3. Ballons de 250 mL.
- 3.4. Microseringues de 100 et 500 μ L.
- 3.5. Entonnoir de filtration cylindrique à filtre poreux G3 (porosité 15 à 40 μ m) de 2 cm de diamètre environ et de 5 cm de hauteur, avec embout approprié pour filtration sous vide et embout rodé mâle.
- 3.6. Fiole de 50 millilitres avec embout rodé femelle adaptable à l'entonnoir de filtration (3.5).
- 3.7. Tube à fond conique, de 10 mL, avec bouchon hermétique.
- 3.8. Dessiccateur contenant du chlorure de calcium.

4. RÉACTIFS

4.1. Matériaux purs

- 4.1.1. Hydroxyde de potassium, grade analytique $\geq 85\%$.
- 4.1.2. Éther diéthylique,, pour chromatographie.
- 4.1.3. Acétone, pour chromatographie.
- 4.1.4. Éthanol, qualité analytique.
- 4.1.5. Acétate d'éthyle, qualité analytique.
- 4.1.6. Sulfate de sodium anhydre, qualité analytique.
- 4.1.7. α -cholestanol, $\geq 95\%$ (par analyse GC).
- 4.1.8. 1-eicosanol, $\geq 98\%$ (par analyse GC).
- 4.1.9. Phénolphtaléine, qualité analytique.

4.2. Solutions de travail

- 4.2.1. Solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, à environ 2 M. Dissoudre, tout en refroidissant, 130 g d'hydroxyde de potassium (4.1.1) dans 200 mL d'eau distillée, puis compléter à 1 L avec de l'éthanol (4.1.4). La solution se conserve dans des bouteilles de verre opaque bien bouchées pendant 2 jours maximum.
- 4.2.2. Solution d'étalon interne de α -cholestanol (4.1.7), solution 0,2% (m/V) dans l'acétate d'éthyle (4.1.5).
- 4.2.3. Solution d'étalon interne de 1-eicosanol (4.1.8), solution 0,1% (m/V) dans l'acétate d'éthyle (4.1.5).
- 4.2.4. Solution de phénolphtaléine (4.1.9), 10 g/L dans l'éthanol (4.1.4).

5. MODE OPÉRATOIRE

Au moyen de la microseringue de 500 μ L (3.4), introduire dans le ballon de 250 mL (3.1) un volume de la solution d'étalon interne d' α -cholestanol (4.2.2.) et un volume de la solution d'étalon interne de 1-eicosanol (4.2.3) contenant une quantité d' α -cholestanol et de 1-eicosanol qui corresponde à environ 10% de la teneur en alcools et en stérols de l'échantillon. Par exemple, pour un échantillon de 5 g d'huile d'olive, ajouter 500 μ L de solution d' α -cholestanol (4.2.2) et 250 μ L de solution de 1-eicosanol (4.2.3). Ajouter 1500 μ L des deux solutions (4.2.2 et 4.2.3) s'il s'agit d'un échantillon d'huile de grignons d'olive. Évaporer sous un léger courant d'azote dans un bain d'eau chaude jusqu'à dessiccation. Après refroidissement du ballon, peser $5,00 \pm 0,01$ g de l'échantillon sec et filtré dans le même ballon.

Note 1 : Dans le cas d'huiles ou de graisses animales ou végétales contenant des quantités importantes de cholestérol, il est possible qu'un pic ayant un temps de rétention identique à celui du α -cholestanol apparaisse. Le cas échéant, la fraction stéroliques devra être analysée en duplicata, avec et sans étalon interne.

Ajouter 50 mL de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 2 M (4.2.1) et de la pierre ponce. Mettre en marche le réfrigérant à reflux, chauffer jusqu'à légère ébullition. Lorsque la saponification s'est produite (la solution devient limpide), continuer à chauffer pendant 20 min, puis verser 50 mL d'eau distillée du haut du réfrigérant. Débrancher le réfrigérant et laisser refroidir le ballon à environ 30 °C.

Transvaser le contenu du ballon quantitativement dans une ampoule à décanter de 500 mL (3.2) en faisant plusieurs lavages à l'eau distillée (50 mL). Ajouter environ 80 mL d'éther diéthylique (4.1.2) et agiter vigoureusement durant environ 60 s. Décompresser régulièrement en retournant le décanteur et en ouvrant le robinet. Laisser reposer jusqu'à complète séparation des deux phases (Note 2). Extraire la solution savonneuse le plus complètement possible dans un deuxième décanteur. Procéder à deux autres extractions sur la phase hydro-alcoolique de la même manière au moyen du 60 à 70 mL d'éther diéthylique (4.1.2).

Note 2 : Les émulsions peuvent être éliminées en ajoutant de petites quantités d'éthanol (4.1.4).

Verser les trois extraits éthériques dans une seule ampoule à décanter contenant 50 mL d'eau. Laver à l'eau (50 mL) jusqu'à ce que la coloration rose de l'eau disparaisse lorsqu'une goutte de solution phénolphtaléine est ajoutée (4.2.4). Après élimination de l'eau de lavage, filtrer sur du sulfate de sodium anhydre (4.1.6) dans un ballon de 250 mL préalablement pesé, en lavant l'ampoule et le filtre avec de petites quantités d'éther diéthylique (4.1.2).

Évaporer le solvant par distillation avec un évaporateur rotatif à 30 °C sous vide. Ajouter 5 mL d'acétone (4.1.3) et éliminer complètement le solvant volatil sous un léger courant d'azote. Sécher le résidu à l'étuve à 103 ± 2 °C pendant 15 min. Faire refroidir dans un dessiccateur et peser à 0,1 mg près.

DEUXIÈME PARTIE : SÉPARATION DES FRACTIONS DE COMPOSÉS ALCOOLIQUES

1. OBJET

La matière insaponifiable préparée dans la première partie est fractionnée en différents composés alcooliques tels que alcools aliphatiques, stérols et dialcools triterpéniques (érythrodiol et uvaol).

2. PRINCIPE

La matière insaponifiable peut être fractionnée par chromatographie basique sur couche mince (méthode de référence), développée. Les bandes correspondantes sont séparées et extraites. Comme méthode alternative de séparation, on pourra utiliser la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec une colonne de gel de silice et un détecteur d'UV. Les différentes fractions seront récupérées. Les alcools aliphatiques et triterpéniques ainsi que les stérols et les dialcools triterpéniques sont isolées ensemble.

3. APPAREILLAGE

Le matériel habituel de laboratoire et en particulier :

- 3.1. Équipement complet pour chromatographie sur couche mince, avec plaques de verre de 20 x 20 cm.
- 3.2. Lampe à lumière ultraviolette, de longueur d'onde de 366 ou 254 nm.
- 3.3. Microseringue de 100 et 500 µL.
- 3.4. Entonnoir de filtration cylindrique à filtre poreux G3 (porosité 15 à 40 micromètres) de 2 centimètres de diamètre environ et de 5 cm de hauteur, avec embout approprié pour filtration sous vide et embout rodé mâle.
- 3.5. Fiole à vide de 50 mL avec embout rodé femelle adaptable à l'entonnoir de filtration (3.4).
- 3.6. Tube à fond conique, de 10 mL, avec bouchon hermétique.
- 3.7. Dessiccateur contenant du chlorure de calcium.
- 3.8. Chromatographe HPLC, équipé de :
 - 3.8.1. Pompe
 - 3.8.2. Injecteur manuel ou automatique équipé d'une boucle d'injection de 200 µL
 - 3.8.3. Dégazeur en continu
 - 3.8.4. Détecteur UV-Visible ou IR
- 3.9. Colonne HPLC (25 cm x 4 mm i.d.) avec gel de silice 60 (taille particules 5 µm)
- 3.10. Filtre à seringue, 0,45 micromètres
- 3.11. Fiole conique, 25 mL

4. RÉACTIFS

4.1. Matériaux purs

- 4.1.1. Hydroxyde de potassium, grade analytique $\geq 85\%$.
- 4.1.2. Éther diéthylique, pour chromatographie.
- 4.1.3. Acétone, pour chromatographie.
- 4.1.4. Éthanol, qualité analytique.
- 4.1.5. Acétate d'éthyle, qualité analytique.
- 4.1.6. n-Hexane, pour chromatographie.
- 4.1.7. 2',7'-dichlorofluorescéine.
- 4.1.8. Plaques de verre recouvertes de gel de silice sans indicateur de fluorescence, de 0,25 mm d'épaisseur (disponibles dans le commerce).

4.2. Solutions de travail

- 4.2.1. Solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, à environ 2 M. Dissoudre, tout en refroidissant, 130 g d'hydroxyde de potassium (4.1.1) dans 200 mL d'eau distillée, puis compléter à 1 L avec de l'éthanol (4.9). La solution se conserve dans des bouteilles de verre opaque bien bouchées pendant 2 jours maximum.
- 4.2.2. Solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, environ 0,2 M. Dissoudre 13 g d'hydroxyde de potassium (4.1.1) dans 20 mL d'eau distillée puis compléter jusqu'à 1L

avec l'éthanol (4.1.4).

- 4.2.3. Solution de référence pour la chromatographie sur couche mince : solution 5% de cholestérol ou phytostérol, alcools et érythrodiol dans l'acétate d'éthyle (4.1.5)
- 4.2.4. Solution de 2',7'-dichlorofluorescéine, 0,2% (m/V) dans l'éthanol (4.1.4). Elle est rendue légèrement basique par addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique 2 M d'hydroxyde de potassium (4.2.1).
- 4.2.5. Mélange de n-hexane (4.1.6) /éther diéthylique (4.1.2) 65:35 (V/V).
- 4.2.6. Phase mobile HPLC : Mélange de n-hexane (4.1.6) /éther diéthylique (4.1.2) 1:1 (V/V).

5. MÉTHODE DE RÉFÉRENCE : SÉPARATION DES COMPOSÉS ALCOOLIQUES PAR CCM BASIQUE

Préparation des plaques pour la chromatographie basique sur couche mince : immerger les plaques de gel de silice (4.1.8) dans environ 4 cm de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0,2 M (4.2.2) pendant 10 s, puis les laisser sécher dans une hotte pendant 2 h avant de les placer dans une étuve à 100 °C pendant 1 h.

Retirer de l'étuve et placer dans un dessiccateur contenant du chlorure de calcium (3.7) jusqu'à utilisation (les plaques traitées de cette manière doivent être utilisées dans les 15 jours).

Introduire le mélange n-hexane/éther diéthylique (4.2.5) (Note 3) dans la cuve de développement à une profondeur d'environ 1 cm. Fermer la cuve à l'aide du couvercle approprié et laisser ainsi pendant au moins une demi-heure, dans un endroit frais, de façon à ce que l'équilibre liquide/vapeur s'établisse. Il est possible de fixer sur la surface intérieure de la cuve des bandes de papier filtre et de les faire tremper dans l'éluant : cette précaution permet de réduire d'un tiers environ le temps de développement et d'obtenir une élution plus uniforme et régulière des composants.

Note 3 : Afin d'avoir des conditions d'élution parfaitement reproductibles, le mélange doit être changé à chaque essai. Un solvant n-hexane/éther diéthylique 50:50 (V/V) peut également être utilisé.

Préparer une solution à 5% (m/V) environ de l'insaponifiable préparé dans la première partie, dans l'acétate d'éthyle (4.1.5) et, avec la micro-seringue de 100 µL (3.3), déposer 0,3 mL de cette solution en une ligne continue fine et uniforme à l'extrémité inférieure (2 cm) de la plaque chromatographique (4.1.8). À la hauteur de cette ligne, déposer 2 à 3 µL de la solution de référence (4.2.3) afin de pouvoir identifier la bande des stérols, des alcools et des dialcools triterpéniques après développement.

Mettre la plaque dans la cuve de développement (3.1). La température ambiante doit être maintenue entre 15 et 20 °C (Note 4). Fermer aussitôt la cuve avec le couvercle et laisser éluer jusqu'à ce que le haut du solvant arrive à environ 1 cm du bord supérieur de la plaque. Extraire la plaque de la cuve de développement et évaporer le solvant sous un courant d'air chaud ou bien laisser la plaque sous hotte pendant quelque temps.

Note 4 : Des températures supérieures pourraient détériorer la séparation.

Vaporiser légèrement et uniformément la plaque avec la solution de 2',7'-dichlorofluorescéine (4.2.4) et laisser sécher. Sur la plaque observée sous lumière UV (3.2), les bandes des stérols, d'alcools et des dialcools triterpéniques peuvent être identifiées par alignement avec les taches

obtenues à l'aide de la solution de référence (4.2.3). Indiquer les limites de la bande avec un crayon noir en suivant les bords de la fluorescence (voir Figure 1 contenant la plaque CCM).

Racler avec une spatule métallique le gel de silice présent dans la zone délimitée. Introduire le matériel retiré, finement broyé, dans l'entonnoir de filtration (3.4). Ajouter 10 mL d'acétate d'éthyle chaud (4.1.5), mélanger soigneusement avec la spatule métallique et filtrer (à l'aide du vide si nécessaire), puis recueillir le filtrat dans la fiole (3.5) reliée à l'entonnoir de filtration.

Laver le résidu dans l'entonnoir de filtration trois fois à l'éther diéthylique (4.1.2) (environ 10 mL chaque fois) et recueillir le filtrat dans la même fiole adaptée à l'entonnoir de filtration. Évaporer le filtrat jusqu'à un volume d'environ 4 à 5 mL, transférer la solution résiduelle dans le tube de 10 mL (3.6) pesé au préalable. Évaporer jusqu'à séchage en chauffant légèrement sous un léger courant d'azote, reprendre avec quelques gouttes d'acétone (4.6) et évaporer à nouveau jusqu'à séchage. Le résidu contenu dans le tube est constitué des fractions stérolique et des dialcools triterpéniques ou des alcools aliphatiques et des alcools triterpéniques.

6. SÉPARATION DE LA FRACTION ALCOOLIQUE PAR HPLC

Préparer l'insaponifiable comme indiqué dans la première partie et le dissoudre dans 3 mL de phase mobile (4.2.6), filtrer la solution avec le filtre à seringue (3.10) et réserver.

Injecter 200 µL de la solution insaponifiable filtrée dans la HPLC(3.8).

Effectuer la séparation dans la HPLC à 0,8 mL/min. Jeter les 5 premières minutes et recueillir dans des fioles coniques de 25 mL (3.11) entre 5 et 10 min pour les alcools aliphatiques et triterpéniques et entre 11 et 25 min pour les stérols et l'érythrodiol et l'uvaol (Note 5).

La séparation peut être suivie à l'aide d'un détecteur UV à une longueur d'onde de 210 nm ou d'un détecteur à indice de réfraction (voir Figure 6).

Évaporer les fractions jusqu'à séchage et les préparer pour l'analyse chromatographique.

Note 5. Contrôler soigneusement la pression de la pompe de la HPLC, l'éther diéthylique peut augmenter la pression, régler le débit pour garder la pression sous contrôle.

TROISIÈME PARTIE. ANALYSE DES FRACTIONS DES COMPOSÉS ALCOOLIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

1. OBJET

Cette partie donne des indications générales sur l'application de la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire pour déterminer la composition qualitative et quantitative des composés alcooliques isolés conformément à la méthode spécifiée dans la deuxième partie de cette méthode.

2. PRINCIPE

Les fractions recueillies à partir de la matière insaponifiable par CCM ou HPLC sont dérivées en triméthylsilyléthers et analysées par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire avec injection en mode *split* et détecteur à ionisation de flamme.

3. APPAREILLAGE

Le matériel habituel de laboratoire et en particulier :

- 3.1. Tube à essai à fond conique, de 10 mL, avec bouchon hermétique en verre.
- 3.2. Une chromatographie en phase gazeuse appropriée au fonctionnement avec colonne capillaire, avec injecteur *split* (injecteur diviseur), constitué de :
 - 3.2.1. Enceinte thermostatée pour la colonne, permettant de maintenir la température désirée avec une précision de $\pm 1^{\circ}\text{C}$;
 - 3.2.2. Ensemble d'injection thermoréglable avec un élément vaporisateur en verre persilanisé et un diviseur ;
 - 3.2.3. Détecteur à ionisation de flamme (FID) ;
 - 3.2.4. Système d'acquisition de données approprié au fonctionnement avec le FID (3.10.3) permettant l'intégration manuelle ;
- 3.3. Colonne capillaire en silice fondue, de 20 à 30 m de long, de 0,25 à 0,32 mm de diamètre intérieur, recouverte intérieurement de 5% Diphenyl – 95% Dimethylpolysiloxane (phase stationnaire SE-52 ou SE-54 ou équivalent), avec une épaisseur comprise entre 0,10 et 0,30 μm ;
- 3.4. Microseringue pour chromatographie en phase gazeuse de 10 μL avec aiguille rigide adaptée à l'injecteur *split*.

4. RÉACTIFS

- 4.1. Pyridine anhydre, pour chromatographie.
- 4.2. Hexaméthylidisilazane, qualité analytique.
- 4.3. Triméthylchlorosilane, qualité analytique.
- 4.4. Solutions échantillons des triméthylsilyléthers de stérols. À préparer au moment de l'emploi à partir des stérols et de l'érythrodiol obtenus des huiles les contenant.
- 4.5. Solutions étalons de triméthylsilyléthers d'alcools aliphatiques de C20 à C28. Elles peuvent être préparées à partir de mélanges d'alcools purs au moment où leur utilisation est nécessaire.
- 4.6. Gaz vecteur : hydrogène ou hélium, pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.7. Gaz auxiliaires : hydrogène, hélium, azote et air, pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.8. Réactif de silylation composé d'un mélange 9:3:1 (V/V/V) de pyridine/hexaméthylidisilazane/triméthylchlorosilane.
- 4.9. n-hexane pour chromatographie

5. PRÉPARATION DES TRIMÉTHYLSILYLÉTHERS (TMSE)

Ajouter, dans le tube à essai (3.1) contenant la fraction alcoolique, le réactif de silylation (4.8) (Note 6) dans une proportion de 50 μL par milligramme de composé alcoolique, en évitant toute absorption d'humidité (Note 7).

Note 6 : Des solutions prêtes à l'emploi sont disponibles dans le commerce. D'autres réactifs silylants sont également disponibles, tels que, par exemple, le bis- triméthylsilyltrifluoracétamide + 1% de triméthylchlorosilane à diluer

dans un volume égal de pyridine anhydre. La pyridine peut être remplacée par la même quantité d'acétonitrile.

Note 7 : La formation éventuelle d'une légère opalescence est normale et n'est pas la cause d'anomalie. La formation d'une floculation blanche ou l'apparition d'une coloration rose sont l'indice de la présence d'humidité ou de l'altération du réactif. Dans ce cas, l'essai doit être répété (uniquement si les réactifs utilisés sont l'hexaméthyldisilazane et le triméthylchlorosilane).

Boucher le tube à essai (3.1), agiter soigneusement (sans retourner) jusqu'à solubilisation complète des composés. Laisser reposer pendant au moins 15 min à température ambiante puis centrifuger pendant quelques minutes : la solution limpide est prête pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

6. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

6.1 Opérations préliminaires, conditionnement de la colonne

Installer la colonne (3.3) dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, en reliant l'extrémité d'entrée à l'injecteur et l'extrémité de sortie au détecteur.

Effectuer les contrôles habituels du système de chromatographie en phase gazeuse (étanchéité du circuit des gaz, efficacité du détecteur, efficacité du système *split* et du système d'enregistrement, etc.).

Si la colonne est utilisée pour la première fois, il est recommandé de procéder à son conditionnement : faire passer un léger flux de gaz au travers de cette colonne, puis mettre l'appareil en marche et chauffer graduellement jusqu'à atteindre une température d'au moins 20 °C supérieure à la température de travail (Note 8). Maintenir cette température pendant au moins 2 h, puis porter l'ensemble aux conditions de fonctionnement (régulation du flux gazeux et du système *split*, allumage de la flamme, jonction avec l'enregistreur électronique, ajustement de la température de la colonne, du détecteur et de l'injecteur, etc.) et enregistrer le signal à une sensibilité au moins deux fois supérieure à celle prévue pour l'exécution de l'analyse. Le tracé de la ligne de base obtenue doit être linéaire, exempt de pics de quelque nature que ce soit, et ne doit pas présenter de dérive. Une dérive rectiligne négative indique un problème d'étanchéité des connexions de la colonne ; une dérive positive indique un conditionnement inadéquat de la colonne.

Note 8 : La température de conditionnement doit toujours être inférieure d'au moins 20 °C à la température maximale prévue pour la phase stationnaire utilisée.

6.2 Conditions opératoires

Optimiser le programme de température et le flux du gaz vecteur afin d'obtenir des chromatogrammes similaires à ceux des **figures 2 à 5**.

Les paramètres suivants ont été testés et jugés utiles :

6.2.1. Alcools aliphatiques

Programme du four	180 °C (8 min.) → 260 °C (à 5 °C/min) → 260 °C (15 min)
Température de l'injecteur	280 °C
Température du détecteur	290 °C
Vitesse linéaire du gaz vecteur	Helium (20 à 30 cm/s); Azote (30 à 50 cm/s)
Rapport de <i>Split</i>	1:50 à 1:100
Volume injecté	0,5 à 1 µL de la solution TMSE

6.2.2. Stérols et dialcools triterpéniques

Programme du four	260 ± 5 °C Isotherme
Température de l'injecteur	280 – 300 °C
Température du détecteur	280 – 300 °C
Vitesse linéaire du gaz vecteur	Helium (20 à 30 cm/s); Azote (30 à 50 cm/s)
Rapport de <i>Split</i>	1:50 à 1:100
Volume injecté	0,5 à 1 µL de la solution TMSE

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et de la chromatographie en phase gazeuse, pour obtenir des chromatogrammes répondant aux exigences suivantes :

- Le temps de rétention de l'alcool C26 doit être de 18 ± 5 min.
- Le pic de l'alcool C22 doit être de $80 \pm 20\%$ de l'échelle pour l'huile d'olive et de $40 \pm 20\%$ de l'échelle pour l'huile de grignons d'olive.
- Le temps de rétention du pic de β -sitostérol est de 20 ± 5 min.
- Le pic du campestérol devrait être de $20 \pm 5\%$ de l'échelle pour l'huile d'olive (teneur moyenne de 3%) .
- Tous les stérols présents doivent être séparés. Les pics doivent être non seulement séparés mais aussi complètement résolus, c'est-à-dire que le tracé du pic doit rejoindre la ligne de base avant la sortie du pic suivant. Une résolution incomplète est toutefois tolérée à condition, cependant, que le pic soit quantifiable à TRR 1,02 (sitostanol) en utilisant la perpendiculaire.

6.3 Procédure d'analyse

Prélever, avec la microseringue de 10 µL, 1 µL d'hexane, aspirer 0,5 µL d'air et successivement de 0,5 à 1 µL de la solution de l'échantillon. Tirer à nouveau le piston de la seringue de façon à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille à travers la membrane de l'injecteur et, après 1 à 2 s, injecter rapidement et extraire ensuite l'aiguille lentement, au bout de 5 s environ. Un injecteur automatique peut également être employé.

Procéder à l'enregistrement jusqu'à élution complète des TMSE des composés alcooliques présents. La ligne de base doit toujours être en accord avec les conditions requises (6.2.1. ou 6.2.2).

6.4 Identification des pics

L'identification des pics individuels est effectuée sur la base des temps de rétention et par comparaison avec les mélanges des TMSE des alcools aliphatiques et triterpéniques ou des stérols et des dialcools triterpéniques, analysés dans les mêmes conditions. Les **figures 4** et **2** illustrent respectivement les chromatogrammes des alcools aliphatiques et triterpéniques et des stérols et des dialcools triterpéniques,

Les alcools aliphatiques sont élués dans l'ordre suivant : : C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol et C28-ol.

Les stérols et les dialcools triterpéniques sont élués dans l'ordre suivant : cholestérol, α -cholestanol (I.S.) brassicastérol, ergostérol, 24- méthylène-cholestérol, campestérol, campestanol, stigmastérol, Δ 7-campestérol, Δ 5,23- stigmastadiénol, clérostérol, β -sistostérol, sitostanol, Δ 5-avenastérol, Δ 5,24- stigmastadiénol, Δ 7-stigmastérol, Δ 7-avenastérol, érythrodiol et uvaol.

6.5 Évaluation quantitative

6.5.1. Calcul de la concentration absolue

Les aires de pic du 1-icosanol et des alcools aliphatiques C22, C24, C26, C28 sont calculées par un système d'acquisition de données. Le facteur de réponse du 1-icosanol doit être considéré égal à 1.

Procéder au calcul des aires des pics de l' α -cholestanol et des stérols et de l'érythrodiol et uvaol au moyen du système informatique. Ne pas considérer les pics des composants non cités dans le **tableau 1** (l'ergostérol ne doit pas être calculé). Le coefficient de réponse de l' α -cholestanol s'entend égal à 1.

Calculer le contenu de chaque composé alcoolique individuel (alcools aliphatiques, stérols, érythrodiol, uvaol), en mg/kg de matière grasse, comme suit :

$$\text{Composé alcoolique } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1000$$

où :

A_x = Aire du pic du composé alcoolique x, en unité d'intégration.

A_s = Aire du pic de l'étalon interne (1-icosanol pour les alcools aliphatiques ou α -cholestanol pour les stérols, érythrodiol et l'uvaol), en unité d'intégration.

m_s = Masse, en milligrammes, de l'étalon interne (1-icosanol pour les alcools aliphatiques ou α -cholestanol pour les stérols, érythrodiol et l'uvaol), ajouté

m = Masse de l'échantillon utilisé pour la détermination, en grammes.

6.5.2. Calcul de la composition relative

Calculer le pourcentage relatif de chaque stérol individuel à partir du rapport de l'aire du pic correspondant par rapport à l'aire totale du pic des stérols :

$$\text{Stérol } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

où :

A_x = Aire du pic du stérol x.

ΣA = Aire totale du pic des stérols.

Calculer le pourcentage relatif du β -sitostérol apparent, en additionnant les pourcentages des stérols suivants : $\Delta 5$ -23-stigmastadiénol + clerostérol + β -sitostérol + sitostanol + $\Delta 5$ -avenastérol + $\Delta 5$ -24-stigmastadiénol.

Calculer le pourcentage relatif de l'érythrodiol et de l'uvaol:

$$\text{Erythrodiol} + \text{Uvaol} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

où:

A_{Er} = Aire de l'érythrodiol, en en unité d'intégration.

A_{Uv} = Aire de l'uvaol, en unité d'intégration.

ΣA_T = Somme des aires de stérols + érythrodiol + uvaol, en unité d'intégration.

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les teneurs en alcools aliphatiques totaux et individuels, en stérols totaux et en érythrodiol sont exprimées en mg/kg de matière grasse. La teneur totale des alcools aliphatiques est la somme de C22, C24, C26 et C28.

Indiquer les stérols individuels en pourcentage (%) des stérols totaux et la somme "érythrodiol + uvaol" en pourcentage (%) de la somme des "stérols totaux + érythrodiol + uvaol".

La teneur en mg/kg de chacun des alcools aliphatiques individuels et de l'érythrodiol et le pourcentage (%) des stérols individuels et de la somme "érythrodiol + uvaol" doivent être exprimés à une décimale près.

La teneur en stérols et alcools aliphatiques totaux doit être exprimée sans décimale.

APPENDICE

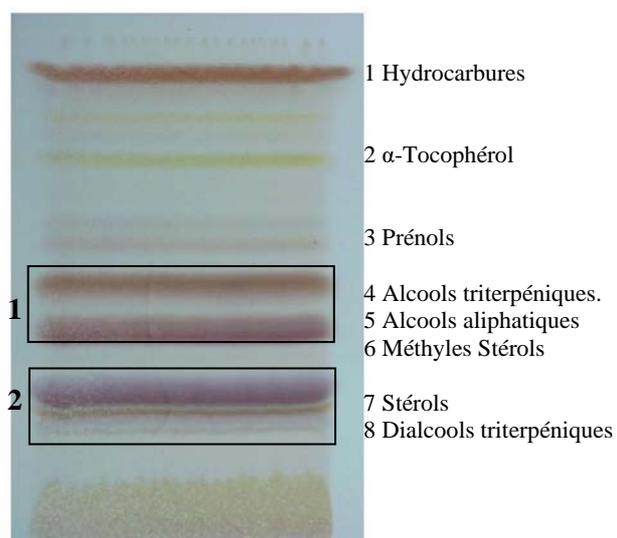


Figure 1. Plaque de chromatographie en couche mince de la fraction insaponifiable de l'huile de grignons d'olive éluée deux fois à l'hexane : éther diéthylique (65:35), développée avec SO_4H_2 (50%) et chauffée. Les bandes à séparer sont les bandes contenues dans le rectangle, 1 sont les bandes pour les alcools aliphatiques et 2 pour les stérols et les dialcools triterpéniques.

TABLEAU I

TEMPS DE RÉTENTION RELATIFS DES STÉROLS

Pic	Identification		Temps de rétention relatif	
			Colonne SE 54	Colonne SE 52
1	Cholestérol	Δ -5-cholestène-3 β -ol	0,67	0,63
2	Cholestanol	5 α -cholestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brassicastérol	[24S]-24-méthyl- Δ -5,22-cholestadiène-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergostérol	[24S] 24 méthyl Δ 5-7-22 cholestatriène 3 β ol	0,78	0,76
4	24-méthylène-cholestérol	24-méthylène- Δ -5,24-cholestadiène-3 β -ol	0,82	0,80
5	Campestérol	(24R)-24-méthyl- Δ -5-cholestène-3 β -ol	0,83	0,81
6	Campestanol	(24R)-24-méthyl-cholestan-3 β -ol	0,85	0,82
7	Stigmastérol	[24S]-24-éthyl- Δ -5,22-cholestadiène-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-campestérol	(24R)-24-méthyl- Δ -7-cholestène-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadiénol	[24S]-24-éthyl- Δ -5,23-cholestadiène-3 β -ol	0,95	0,95
10	Clerostérol	[24S]-24-éthyl- Δ -5,25-cholestadiène-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -sitostérol	(24R)-24-éthyl- Δ -5-cholestène-3 β -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-éthyl-cholestane-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-avenastérol	(24Z)-24-éthylidène- Δ -5-cholestène-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5-24-stigmastadiénol	[24S]-24-éthyl- Δ -5,24-cholestadiène-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmasténol	[24S]-24-éthyl- Δ -7-cholestadiène-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avenastérol	(24Z)-24-éthylidène- Δ -cholestène-7-3 β -ol	1,16	1,16
17	Érythrodiol	5 α oléana-12en-3 β 28 diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-ursène-3 β 28 diol	1,52	1,52

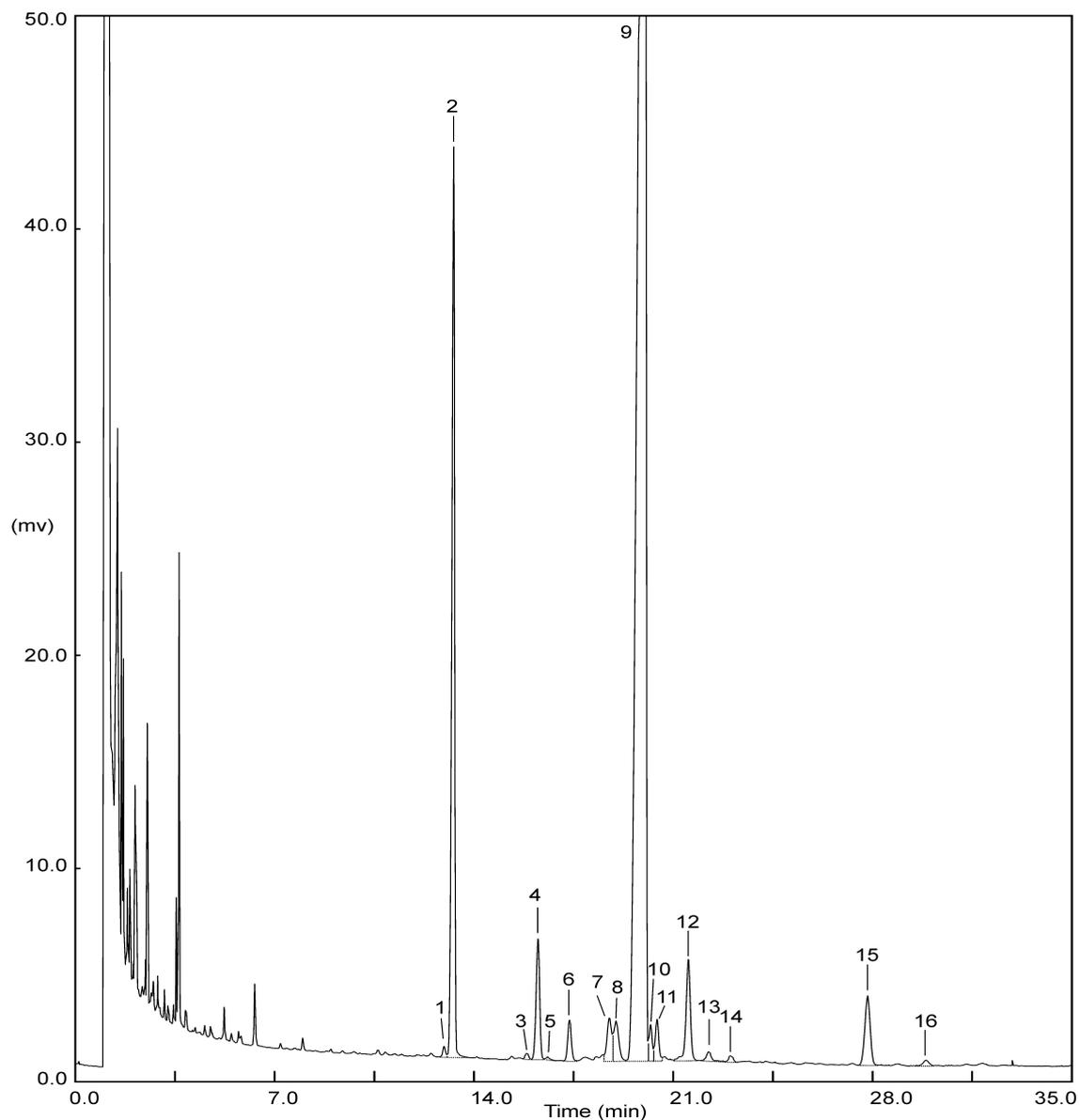


Figure 2. Profil chromatographique GC-FID des stérols et dialcools triterpéniques de l'huile d'olive raffinée. (1) cholestérol, (2) α -cholestanol (I.S.), (3) 24-méthylène-cholestérol, (4) campestérol, (5) campestanol, (6) stigmastérol, (7) Δ 5,23-stigmastadiénol, (8) clérol, (9) β -sitostérol, (10) sitostanol, (11) Δ 5-avenastérol, (12) Δ 5,24-stigmastadiénol, (13) Δ 7-stigmastérol, (14) Δ 7-avenastérol, (15) érythrodiol, (16) uvaol.

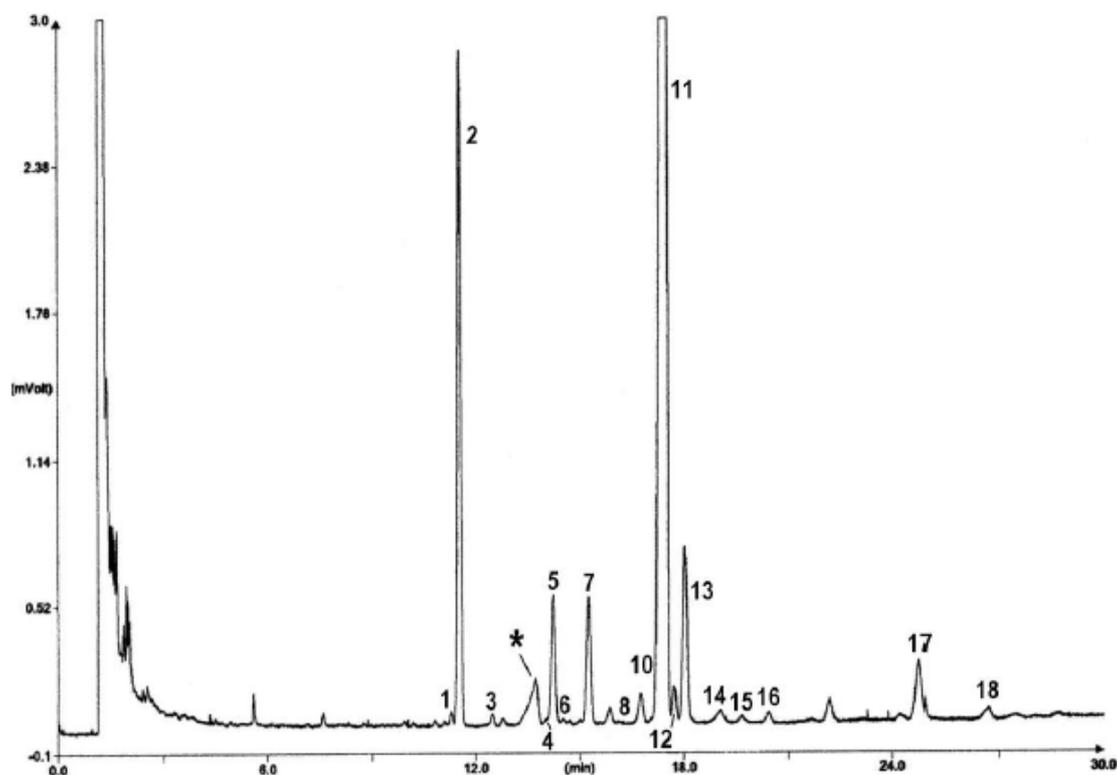


Figure 3. Profil chromatographique GC-FID des stérols et dialcools triterpéniques d'une huile d'olive lampante. (1) cholestérol, (2) α -cholestanol (I.S.), (3) brassicastérol, (4) 24-méthylène-cholestérol, (5) campestérol, (6) campestanol, (7) stigmastérol, (8) Δ 7-campestérol, (10) clérol, (11) β -sitostérol, (12) sitostanol, (13) Δ 5-avenastérol, (14) Δ 5,24-stigmastadiénol, (15) Δ 7-stigmastérol, (16) Δ 7-avenastérol, (17) érythrodiol, (18) uvaol

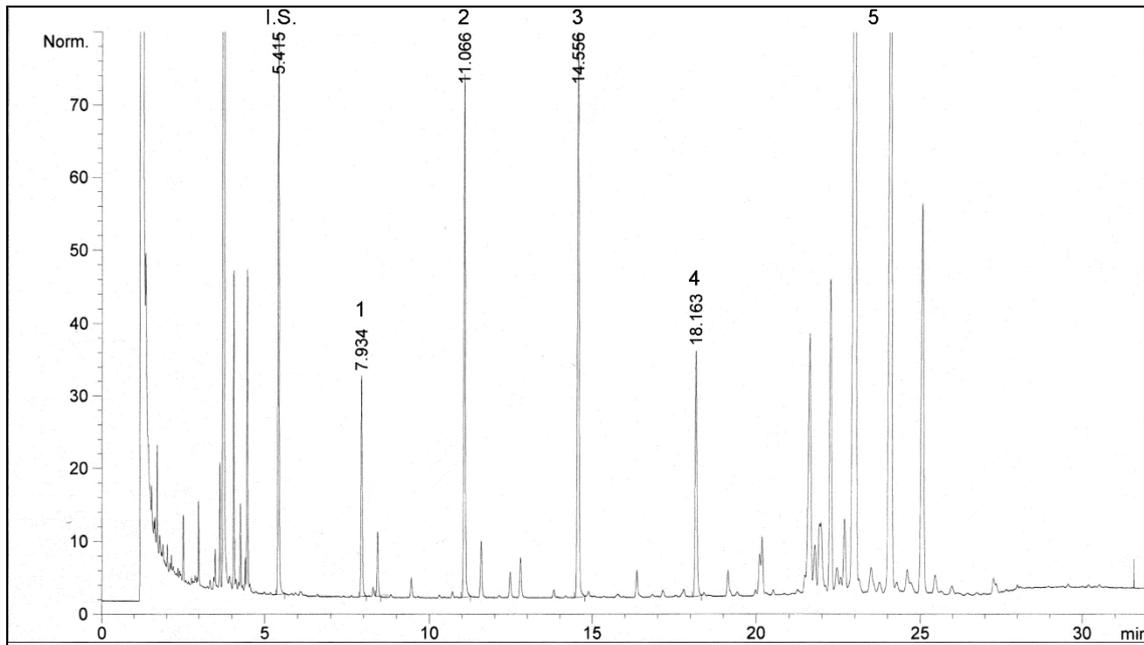


Figure 4. Profil chromatographique GC-FID des alcools aliphatiques et des alcools triterpéniques de l'huile d'olive. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) alcools triterpéniques.

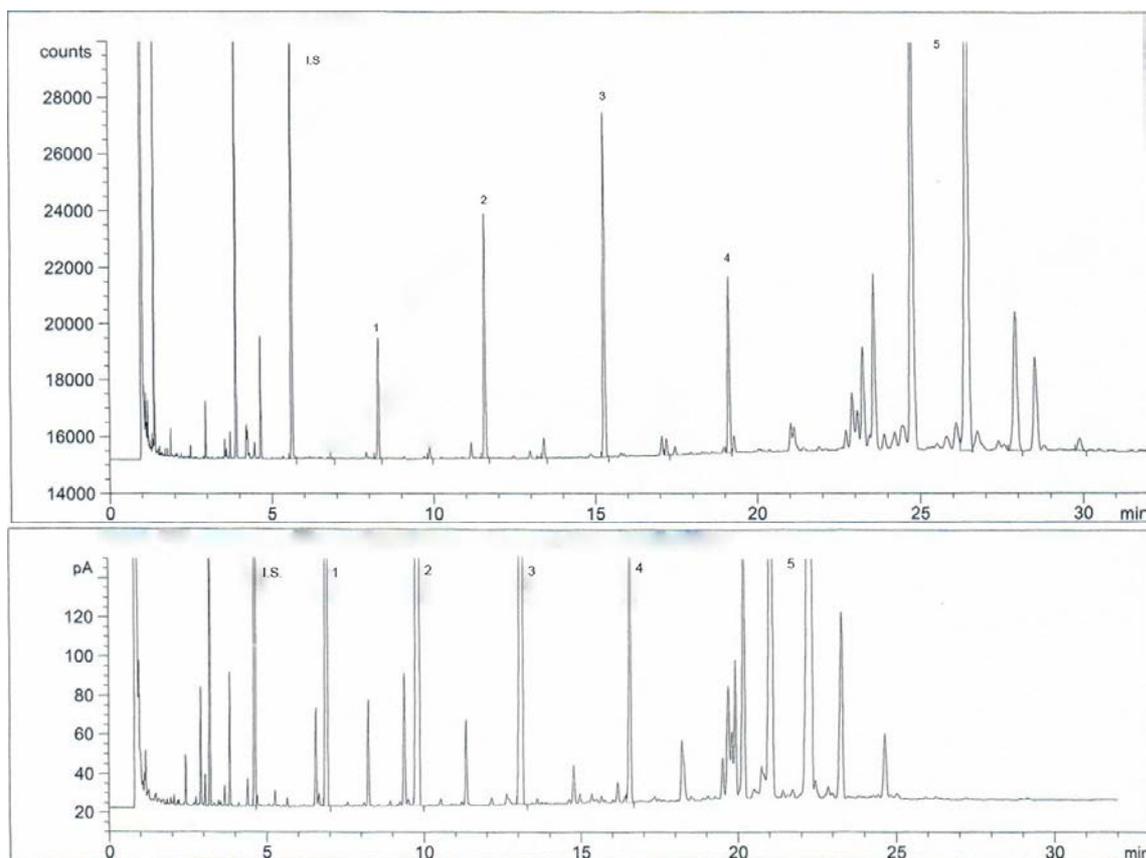


Figure 5- Profil chromatographique GC-FID des alcools aliphatiques et des alcools triterpéniques d'une huile d'olive raffinée et d'une huile d'olive de seconde centrifugation. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) alcools triterpéniques.

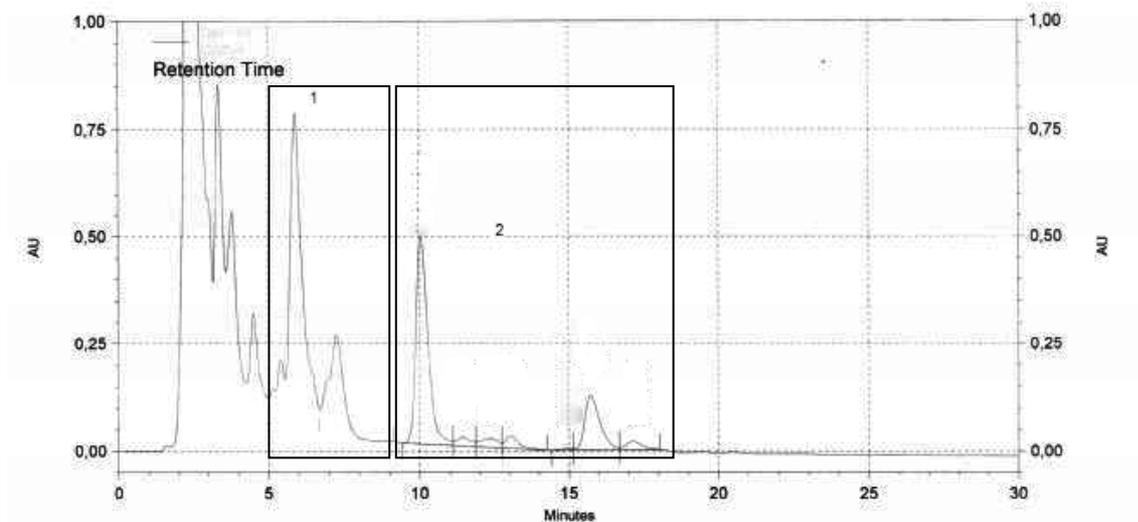


Figure 6. Chromatogramme HPLC d'une huile d'olive insaponifiable séparée par HPLC avec un détecteur UV. (1) Alcools aliphatiques et triterpéniques ; (2) Stérols et dialcools triterpéniques.

MARGES DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE

1. Analyse des résultats de l'essai collaboratif pour la teneur en stérols et les composés alcooliques

Les marges de précision de la méthode figurent dans le tableau ci-après pour chaque paramètre étudié.

n	nombre de laboratoires participants
outliers	Nombre de laboratoires aux résultats aberrants
mean	Moyenne des résultats acceptés
r	Répétabilité
S_r	Écart-type de répétabilité
RSD_r (%)	Coefficient de variation de répétabilité ($S_r \times 100/\text{mean}$)
R	Reproductibilité
S_R	Écart-type de reproductibilité
RSD_R (%)	Coefficient de variation de reproductibilité ($S_R \times 100/\text{mean}$)

Résultats de l'essai interlaboratoire visant à séparer la fraction insaponifiable par CCM et HPLC du stérol et de la fraction alcoolique. Évaluation de la teneur absolue en érythrodiol et en uvaol. Un essai interlaboratoire a été réalisé en 2016 conformément à la norme ISO 5725. Les résultats sont résumés dans les tableaux A.1 à A.22.

A: huile d'olive vierge extra de la variété Picual

B: huile d'olive lampante

C: huile d'olive + 10% huile de tournesol

D: huile de tournesol à teneur élevée en acide oléique + 50 mg/kg erythrodiol + 20 mg/kg uvaol

E: huile d'olive vierge + huile de grignons d'olive raffinée

Tableau A.1— Cholestérol (% stérols totaux) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	0	1	0	0
mean (%)	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
r	0,03	0,10	0,05	0,07	0,03
S _r	0,01	0,04	0,02	0,03	0,01
RSD _r (%)	8,3	13,6	14,2	20,2	8,6
R	0,06	0,28	0,09	0,14	0,07
S _R	0,02	0,10	0,03	0,05	0,02
RSD _R (%)	15,9	37,5	22,5	40,3	23,4

Tableau A.2— Cholestérol (% stérols totaux) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	0	0	0	0
mean (%)	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
r	0,03	0,10	0,07	0,03	0,04
S _r	0,01	0,04	0,02	0,01	0,01
RSD _r (%)	7,6	15,0	17,7	9,3	10,8
R	0,06	0,24	0,09	0,11	0,06
S _R	0,02	0,08	0,03	0,04	0,02
RSD _R (%)	16,5	34,3	23,2	35,4	16,7

Tableau A.3— Brassicastérol (% stérols totaux) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	1	0	0	1	1
mean (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
r	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02
S _r	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
RSD _r (%)	68,1	23,6	39,3	25,3	14,7
R	0,03	0,11	0,09	0,07	0,15
S _R	0,01	0,04	0,03	0,03	0,05
RSD _R (%)	103,7	90,5	105,3	94,5	90,7

Tableau A.4— Brassicastérol (% stérols totaux) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	1	0	1	0
mean (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
r	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03
S _r	0,004	0,01	0,01	0,01	0,01
RSD _r (%)	23,9	19,9	30,0	35,6	22,5
R	0,04	0,06	0,05	0,04	0,09
S _R	0,02	0,02	0,02	0,01	0,03
RSD _R (%)	90,3	68,0	88,7	83,3	79,8

Tableau A.5— Campesterol (% stérols totaux) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	2	0	0	0	1
mean (%)	3,1	3,2	3,9	8,3	3,1
r	0,22	0,15	0,26	0,18	0,15
S _r	0,08	0,06	0,09	0,06	0,05
RSD _r (%)	2,6	1,7	2,4	0,8	1,7
R	0,25	0,39	0,45	0,78	0,27
S _R	0,09	0,13	0,16	0,28	0,10
RSD _R (%)	2,9	4,3	4,1	3,4	3,1

Tableau A.6— Campesterol (% stérols totaux) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	1	0	0	0
mean (%)	3,0	3,3	3,9	8,4	3,2
r	0,12	0,13	0,18	0,22	0,11
S _r	0,04	0,05	0,06	0,08	0,04
RSD _r (%)	1,5	1,4	1,6	0,9	1,3
R	0,48	0,59	0,37	0,52	0,28
S _R	0,17	0,21	0,13	0,18	0,10
RSD _R (%)	5,7	6,5	3,4	2,2	3,2

Tableau A.7— Stigmastérol (%stérols totaux) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	0	0	1	0
mean (%)	1,1	2,4	2,0	7,2	1,3
r	0,07	0,16	0,25	0,12	0,09
S _r	0,02	0,06	0,09	0,04	0,03
RSD _r (%)	2,1	2,4	4,5	0,6	2,5
R	0,18	0,29	0,41	0,62	0,11
S _R	0,06	0,10	0,15	0,22	0,04
RSD _R (%)	5,9	4,3	7,4	3,1	3,0

Tableau A.8— Stigmastérol (% stérols totaux) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	0	0	1	0
mean (%)	1,1	2,4	2,0	7,2	1,3
r	0,07	0,14	0,08	0,21	0,16
S _r	0,03	0,05	0,03	0,08	0,06
RSD _r (%)	2,3	2,1	1,5	1,1	4,4
R	0,15	0,22	0,11	0,45	0,19
S _R	0,06	0,08	0,04	0,16	0,07
RSD _R (%)	5,1	3,3	2,0	2,2	5,3

Tableau A.9— β -Sitostérol apparent (% stérols totaux) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	0	1	1	1
mean (%)	94,4	92,6	89,0	61,1	94,0
r	0,45	0,37	1,43	1,43	0,33
S _r	0,16	0,13	0,51	0,51	0,12
RSD _r (%)	0,17	0,14	0,57	0,84	0,13
R	0,76	1,31	1,79	4,00	0,63
S _R	0,27	0,47	0,63	1,43	0,23
RSD _R (%)	0,29	0,51	0,72	2,34	0,24

Tableau A.10 — β -Sitostérol apparent (% stérols totaux) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	15	15	15	15	14
outliers	0	0	1	1	1
mean (%)	94,4	92,5	88,7	60,7	94,1
r	0,38	0,45	1,15	1,08	0,50
S _r	0,13	0,16	0,41	0,39	0,18
RSD _r (%)	0,14	0,17	0,46	0,63	0,19
R	0,81	1,11	1,41	4,04	0,99
S _R	0,29	0,40	0,51	1,44	0,35
RSD _R (%)	0,31	0,43	0,57	2,38	0,38

Tableau A.11 — Δ 7-Stigmastérol (% stérols totaux) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	0	0	0	1
mean (%)	0,3	0,4	3,2	16,0	0,5
r	0,06	0,08	0,53	1,08	0,06
S _r	0,02	0,03	0,19	0,39	0,02
RSD _r (%)	7,5	6,4	5,9	2,4	4,4
R	0,15	0,19	0,83	1,52	0,19
S _R	0,05	0,07	0,30	0,54	0,07
RSD _R (%)	18,7	16,0	9,4	3,4	13,5

Tableau A.12 — Δ 7-Stigmastérol (% stérols totaux) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	1	0	0	0	0
mean (%)	0,32	0,46	3,22	16,09	0,52
r	0,10	0,12	0,38	0,75	0,08
S _r	0,037	0,041	0,13	0,267	0,029
RSD _r (%)	11,4	9,0	4,2	1,7	5,6
R	0,13	0,24	0,75	1,95	0,16
S _R	0,045	0,087	0,269	0,696	0,058
RSD _R (%)	14,2	18,8	8,3	4,3	11,0

Tableau A.13 — Teneur stérols totaux (mg/kg) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	1	0	0	1	1
mean (mg/kg)	1572	1742	1679	2830	3181
r	84,9	134,8	144,7	246,2	307,3
S _r	30,3	48,1	51,7	87,9	109,7
RSD _r (%)	1,9	2,8	3,1	3,1	3,5
R	291,3	495,9	321,6	346,4	610,4
S _R	104,0	177,1	114,8	123,7	218,0
RSD _R (%)	6,6	10,2	6,8	4,4	6,9

Tableau A.14 — Teneur stérols totaux (mg/kg) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	1	1	1	1	0
mean (mg/kg)	1583	1754	1730	2897	3216
r	74,0	93,5	95,0	59,01	181,9
S _r	264,4	33,4	33,9	21,1	65,0
RSD _r (%)	1,7	1,9	2,0	0,7	2,0
R	315,0	190,2	156,6	230,2	480,2
S _R	112,5	67,9	55,9	82,2	171,5
RSD _R (%)	7,1	3,9	3,2	2,8	5,3

Tableau A.15 — Erythrodiol + uvaol (% stérols totaux) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	1	0	1	0	0
mean (%)	2,1	3,8	1,2	2,5	17,2
r	0,32	0,34	0,19	0,27	0,76
S _r	0,12	0,12	0,07	0,10	0,27
RSD _r (%)	5,4	3,2	5,4	3,9	1,6
R	0,80	0,85	0,53	1,09	4,68
S _R	0,29	0,30	0,19	0,39	1,67
RSD _R (%)	13,3	8,0	15,3	15,5	9,7

Tableau A.16 — Erythrodiol + uvaol (% stérols totaux) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	0	0	0	0
mean (%)	2,2	3,8	1,4	2,0	17,2
r	0,40	0,32	0,24	0,16	0,73
S _r	0,14	0,11	0,09	0,06	0,26
RSD _r (%)	6,5	3,0	6,1	2,8	1,5
R	0,52	0,57	0,46	0,62	3,66
S _R	0,19	0,20	0,17	0,22	1,31
RSD _R (%)	8,4	5,3	11,8	10,9	7,6

Tableau A.17 — Teneur en érythrodiol (mg/kg) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	1	1	1	1	1
mean (mg/kg)	31	61	17	52	598
r	2,8	4,4	1,5	4,0	71,0
S _r	1,0	1,6	0,5	1,4	25,3
RSD _r (%)	3,3	2,6	3,1	2,7	4,2
R	6,0	21,0	10,2	9,4	148,3
S _R	2,1	2,6	3,6	3,3	53,0
RSD _R (%)	7,0	12,4	20,8	6,5	8,9

Tableau A.18 — Teneur en uvaol (mg/kg) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	2	1	1	1	2
mean (mg/kg)	3,0	8	4	20	65
r	0,83	1,5	3,3	3,5	12,5
S _r	0,30	0,55	1,2	1,2	4,5
RSD _r (%)	10,1	6,8	27,8	6,2	6,8
R	4,6	9,0	4,1	3,5	23,1
S _R	1,6	3,2	1,5	1,2	8,3
RSD _R (%)	55,6	40,0	34,0	6,2	12,7

Tableau A.19 — Teneur en érythrodiol (mg/kg) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	1	1	0	0	1
mean (mg/kg)	32	60	18	51	605
r	3,0	8,8	2,5	5,6	36,5
S _r	1,1	3,1	0,9	2,0	13,0
RSD _r (%)	3,3	5,2	5,1	4,0	2,2
R	7,3	23,1	5,6	5,8	152,5
S _R	2,6	8,2	2,0	2,0	54,5
RSD _R (%)	8,1	13,7	11,4	4,1	9,0

Tableau A.20 — Teneur en uvaol (mg/kg) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	1	1	0	1
mean (mg/kg)	5	8	5	20,0	65
r	1,6	1,3	0,80	2,8	6,5
S _r	0,55	0,48	0,29	1,0	2,3
RSD _r (%)	10,2	5,7	5,7	5,2	3,6
R	4,2	6,8	3,4	3,5	15,5
S _R	1,5	2,4	1,2	1,3	5,5
RSD _R (%)	27,3	28,6	24,0	6,4	8,5

Tableau A.21 — Teneur en alcools aliphatiques (mg/kg) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	1	0	0	0
mean (mg/kg)	143	420	62	78	1512
r	5,5	23	4,5	5,1	70
S _r	1,9	8,2	1,6	1,8	24,9
RSD _r (%)	1,4	2,0	2,6	2,3	1,7
R	25	67	10	10	95
S _R	8,9	23,8	3,7	3,6	34,7
RSD _R (%)	6,2	5,7	6,1	4,7	2,3

Tableau A.22 — Teneur en alcools aliphatiques (mg/kg) par HPLC

Échantillon	A	B	C	D	E
n	14	14	14	14	14
outliers	0	0	0	0	1
mean (mg/kg)	139	423	62	78	1495
r	6,9	15	6,2	5,9	46
S_r	2,5	5,3	2,2	2,1	16,2
RSD_r(%)	1,8	1,3	3,6	2,7	1,1
R	23	36	9,0	11	86
S_R	8,4	12,9	3,2	3,8	30,8
RSD_R(%)	6,0	3,1	5,2	4,9	2,1

2. Analyse des résultats de l'essai collaboratif concernant la teneur en dialcools triterpéniques

Résultats de l'essai interlaboratoire pour séparer la fraction insaponifiable par CCM de la fraction des dialcools triterpéniques. Évaluation du % et de la teneur absolue en érythrodiol et en uvaol. Un essai interlaboratoire a été réalisé en 2016 conformément à la norme ISO 5725. Les résultats sont résumés dans les tableaux B.1 à B.6 pour chaque paramètre étudié

n_p	nombre de laboratoires participants
outliers	Nombre de laboratoires aux résultats aberrants
mean	Moyenne des résultats acceptés
r	Répétabilité
S_r	Écart-type de répétabilité
RSD_r (%)	Coefficient de variation de répétabilité ($S_r \times 100/\text{mean}$)
R	Reproductibilité
S_R	Écart-type de reproductibilité
RSD_R (%)	Coefficient de variation de reproductibilité ($S_R \times 100/\text{mean}$)

A: Huile d'olive lampante

B: Huile d'olive raffinée (de l'échantillon 1)

C: Huile de tournesol à teneur élevée en acide oléique destérolisée + 3,13% / 49,26 mg/kg d'érythrodiol standard

D: Huile de grignons d'olive (commercialisée) identique à D

E: Huile de grignons d'olive (commercialisée) identique à E

Tableau B.1 Erythrodiol + uvaol (% stérols totaux) au moyen de la méthode de référence (CCM)

Échantillon	A	B	C	D	E
n	17	17	17	17	17
outliers	1	3	3	2	3
mean (%)	3,3	4,3	3,5	22,8	22,7
r	0,3	0,7	0,2	1,5	1,5
S_r	0,1	0,2	0,1	0,5	0,5
RSD_r(%)	3,1	5,7	2,3	2,3	2,4
R	2,6	1,1	0,7	3,0	3,3
S_R	0,9	0,4	0,2	1,1	1,2
RSD_R(%)	28,5	9,0	7,0	4,7	5,1

Tableau B.2 Teneur en érythrodiol + uvaol (mg/kg) au moyen de la méthode de référence (CCM)

	A	B	C	D	E
n	16	16	17	16	16
outliers	3	4	3	2	3
mean (mg/kg)	59	50	52	772	745
r	6,5	6,7	4,7	40	100
S_r	2,3	2,4	1,7	14	36
RSD_r(%)	3,9	4,8	3,3	1,8	4,8
R	9,9	14	31	146	183
S_R	3,5	4,8	11	52	65
RSD_R(%)	6,0	9,8	21,5	6,8	8,8

Tableau B.3 Erythrodiol (% stérols totaux) au moyen de la méthode de référence (CCM)

	A	B	C	D	E
n	17	17	16	17	17
outliers	1	3	1	2	3
mean (%)	3,1	3,9	3,4	18,8	18,7
r	0,3	0,6	0,2	1,2	1,5
S_r	0,1	0,2	0,1	0,4	0,5
RSD_r(%)	3,1	5,3	2,4	2,3	2,9
R	0,8	1,0	0,6	2,8	2,8
S_R	0,3	0,4	0,2	1,0	1,0
RSD_R(%)	8,9	9,1	6,6	5,3	5,3

Tableau B.4: Teneur en érythrodiol (mg/kg) au moyen de la méthode de référence (CCM)

	A	B	C	D	E
n	16	16	16	16	16
outliers	1	3	2	0	2
mean (mg/kg)	53	46	48	638	635
r	5,1	13	4,1	41	78
S_r	1,8	4,6	1,5	15	28
RSD_r(%)	3,4	9,9	3,1	2,3	4,4
R	13	16	12	125	130
S_R	4,7	5,7	4,1	45	46
RSD_R(%)	8,8	12,2	8,6	7,0	7,3

Tableau B.5 Uvaol (% stérols totaux) au moyen de la méthode de référence (CCM)

	A	B	C	D	E
n	16	16	16	16	16
outliers	1	1	3	1	0
mean (%)	0,4	0,4	0,1	4,0	4,1
r	0,1	0,3	0,1	0,4	0,3
S_r	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1
RSD_r(%)	11,4	23,3	35,8	3,4	2,4
R	0,7	0,2	0,1	0,6	0,7
S_R	0,2	0,1	0,0	0,2	0,3
RSD_R(%)	55,4	22,5	86,9	5,5	6,2

Tableau B.6 Teneur en uvaol (mg/kg) au moyen de la méthode de référence (CCM)

	A	B	C	D	E
n	15	14	15	14	13
outliers	2	1	3	0	1
mean (mg/kg)	7,6	4,6	0,8	136	138
r	2,5	2,6	1,0	12	22
S_r	0,9	0,9	0,3	4,4	8,0
RSD_r(%)	11,6	20,0	43,3	3,2	5,8
R	11	3,3	2,2	31	36
S_R	3,9	1,2	0,8	11,0	12,8
RSD_R(%)	51,6	25,8	99,0	8,1	9,2