



DÉTERMINATION DES BIOPHENOLS DES HUILES D'OLIVE PAR HPLC

- 1** **OBJET**
- La présente norme décrit un procédé d'extraction et de détermination de la teneur en composés mineurs polaires de nature biophénolique (BMP) tels que les dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligstroside, des lignanes, les flavonoïdes et les acides phénoliques présents dans les huiles d'olive, au moyen de la technique HPLC. L'intervalle de mesure est compris entre 30 mg/kg et 800 mg/kg.
- AVERTISSEMENT:** la présente norme peut requérir l'emploi d'appareillages et de substances dangereuses ou l'exécution d'opérations comportant un certain risque. La méthode ne prévoit pas tous les problèmes de sécurité que son emploi peut poser. Dès lors, il appartient à quiconque l'utilise de rechercher et d'établir préalablement les mesures de sécurité appropriées et les mesures législatives éventuelles à appliquer.
- 2** **PRINCIPE**
- La méthode se base sur une extraction des composés mineurs polaires de nature biophénolique directement à partir de l'huile d'olive au moyen d'une solution méthanolique, suivie de leur dosage par HPLC au moyen d'un révélateur UV à 280 nm. L'étalon interne est constitué d'acide syringique.
- La teneur correspondant aux dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligstroside, des lignanes, des flavonoïdes et des acides phénoliques est exprimée en mg/kg de tyrosol.
- 3** **APPAREILLAGE**
- 3.1** **Chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC)**, à gradient ternaire, muni d'une colonne (4,6 mm x 25 cm) à phase inverse C18, de type Spherisorb ODS-2 5µm, 100 Å, équipé d'un détecteur spectrophotométrique UV à 280 nm et d'un intégrateur. Température ambiante.
- L'enregistrement des spectres par un essai d'identification est facilité par l'emploi d'un détecteur récepteur photodiode avec portée d'acquisition de 200 nm à 400 nm.
- 3.2** **Ballons** de 10 ml et 100 ml Classe A.
- 3.3** **Pipettes** de 100 µl, 1 000 µl et 5 000 µl.
- 3.4** **Éprouvettes** avec bouchon à vis de 10 ml.
- 3.5** **Agitateur** pour éprouvette¹
- 3.6** **Bain d'extraction à ultrasons.**
- 3.7** **Filtres seringue** Ø13 mm type PVDF 0,45 µm.

¹ type Vortex.

- 3.8 **Centrifugeuse** permettant d'assurer une vitesse de centrifugation de 5 000 min⁻¹.
- 3.9 **Balance analytique**, garantissant une précision de ± 0,001 g.
- 3.10 **Seringues** en plastique de 5 ml.
- 3.11 Verrerie normale de laboratoire.

4 **RÉACTIFS**

Les réactifs doivent être purs pour les analyses chromatographiques HPLC.

- 4.1 **Acide orthophosphorique 85 % (V/V)**.
- 4.2 **Méthanol** pour chromatographie.
- 4.3 **Acétonitrile** pour chromatographie.
- 4.4 **Eau** pour chromatographie.
- 4.5 **Gradient ternaire linéaire d'élution** : eau 0,2 % H₃PO₄ (V/V) (A), méthanol (B), acétonitril (C). Les solvants d'élution doivent être dégazés.
Le développement du gradient doit intervenir selon le schéma suivant:

gradient d'élution

Temps min	Flux ml/min	A %	B %	C %
0	1,00	96	2	2
40	1,00	50	25	25
45	1,00	40	30	30
60	1,00	0	50	50
70	1,00	0	50	50
72	1,00	96	2	2
82	1,00	96	2	2

- 4.6 **2- (4 - hydroxyphényl) éthanol (tyrosol) ≥ 99,9 %**.
- 4.7 **Acide 3,5 diméthoxy 4- hydroxy benzoïque (acide syringique) ≥ 97 %**.
- 4.8 **Solution pour l'extraction**: méthanol/eau 80/20 (V/V).
- 4.9 **Solution des étalons externes d'étalonnage (tyrosol et acide syringique)**. Peser exactement 0,030 g de tyrosol (4.6) et 0,015 g d'acide syringique (4.7) dans un ballon taré de 10 ml (3.2). Diluer jusqu'au volume avec la solution méthanol/eau 80/20 (V/V) (4.8). Prélever 100 µl (3.3) de la solution et la transférer dans un ballon taré de 10 ml. Diluer jusqu'au volume avec la solution méthanol/eau 80/20 (V/V) (4.8). Les concentrations de la solution d'étalonnage externe sont : tyrosol 0,030 mg/ml, acide syringique 0,015 mg/ml.
Cette solution reste stable pendant 3 mois au réfrigérateur à + 4°C.

- 4.10 Préparation de la solution étalon interne (acide syringique).** Peser exactement 0,015 g d'acide syringique (4.7) dans un ballon taré de 10 ml et porter jusqu'au volume avec la solution de méthanol/eau 80/20 (V/V) (4.8). Prélever 1 ml (3.3) de la solution, la transférer dans un ballon taré de 100 ml (3.2) et porter jusqu'au volume avec la même solution de méthanol/eau 80/20 (V/V) (4.8). La concentration finale est de 0,015 mg/ml. Cette solution reste stable pendant 3 mois au réfrigérateur à + 4°C.

5 PROCÉDURE

5.1 Préparation de l'échantillon

Peser exactement 2,0 g d'huile d'olive dans une éprouvette munie d'un bouchon à vis de 10 ml (3.4).

Verser 1 ml de la solution d'étalon interne (4.10) à l'échantillon préalablement pesé.

Fermer avec le bouchon à vis et agiter pendant exactement 30 secondes (3.5).

Ajouter 5 ml de la solution d'extraction constituée de méthanol/eau 80/20 (V/V) (4.8).

Agiter (3.5) pendant 1 minute exactement.

Isoler dans le bain à ultrasons (3.6) pendant 15 min à température ambiante.

Centrifuger à 5 000 tours/min pendant 25 min (3.8).

Prélever une aliquote du surnageant et filtrer au moyen d'une seringue en plastique de 5 ml (3.10) à l'aide d'un filtre en PVDF de 0,45 µm (3.7).

5.2 Analyse HPLC

Allumer le spectrophotomètre UV au moins 1 heure avant l'analyse.

La colonne chromatographique doit être conditionnée au moins 15 min avec le solvant d'élution de composition initiale (eau 0,2 % H₃PO₄ (V/V) /méthanol/acétonitril 96/2/2 (V/V/V)) (schéma gradient d'élution).

Un premier essai chromatographique à "gradient vide" devrait toujours être réalisé au préalable (pour garantir l'absence de pics d'interférence de coélution), en injectant 20 µl de méthanol/eau 80/20 (V/V) (4.8) dans le système HPLC.

Injecter 20 µl de la solution d'étalon externe (4.9) et enregistrer le chromatogramme à 280 nm. Calculer les valeurs des facteurs de réponse RF relatifs à 1 µg de tyrosol et à 1 µg d'acide syringique (6.1).

Calculer le rapport entre le facteur de réponse de l'acide syringique et le tyrosol, appelé RRF_{sir/tyr}. Noter les valeurs (6.2).

Injecter 20 µl de la solution finale de l'échantillon dans le système HPLC et enregistrer le chromatogramme à 280 nm.

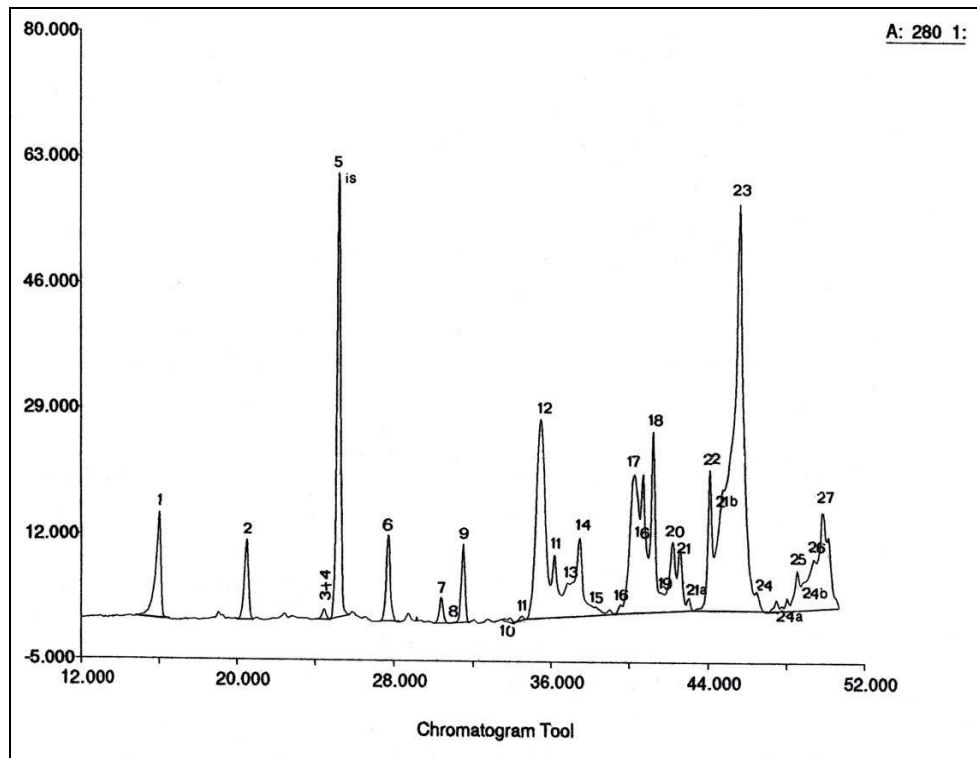
Réaliser deux déterminations indépendantes sur le même échantillon et vérifier que les résultats s'inscrivent dans les paramètres de précision de la méthode.

La figure 1 annexée représente un chromatogramme typique des biophénols d'une huile d'olive vierge extra caractérisée par composant.

Pour évaluer la teneur totale, on considérera la somme des aires des différents pics.

A la fin de la journée, verser dans la colonne chromatographique le méthanol/acétonitril 1/1 (V/V) à 1,0 ml/min pendant au moins 15 min et conserver la colonne dans le méthanol/acétonitril 1/1 (V/V).

Figure 1 chromatogramme HPLC enregistré à 280nm correspondant à des biophénols typiques présents dans une huile d'olive vierge extra.



6 EXPRESSION DES RÉSULTATS

6.1 Calcul des facteurs de réponse des étalons externes (RF)

$RF_{1\mu g}$ (acide syringique) = Aire acide syringique / μg acide syringique injecté

$RF_{1\mu g}$ (tyrosol) = Aire tyrosol / μg tyrosol injecté

6.2 Calcul du rapport entre les deux facteurs de réponse (RRF)

$RRF_{sir/tir} = RF_{1\mu g}$ (acide syringique) / $RF_{1\mu g}$ (tyrosol)

la valeur de $RRF_{sir/tir}$ doit être constante et comprise dans un intervalle $5,1 \pm 0,4$. Elle permet d'exprimer le résultat final en tyrosol, en utilisant l'acide syringique comme étalon interne.

6.3

Calcul de la teneur en biophénols dans l'huile d'olive vierge

La teneur en biophénols (dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligstroside, des lignanes, des flavonoïdes et des acides phénoliques) exprimée en mg/kg est calculée en mesurant la somme des aires des pics chromatographiques correspondants (identifiés dans le tableau 1), selon la formule suivante. Le résultat est exprimé sans décimale.

$$(\text{mg/kg}) = \frac{(\Sigma A) \times 1\,000 \times \text{RRF}_{\text{sir/tir}} \times (\text{P ac. syr.})}{(\text{A ac. syr.}) \times (\text{P})}$$

où:

(ΣA) est la somme des aires des pics des biophénols (hydroxytyrosol, tyrosol, dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligstroside, des lignanes, des flavonoïdes et des acides phénoliques) enregistrée à 280 nm ;

A ac. sy. est l'aire de l'étalon interne d'acide syringique enregistrée à 280 nm ;

1 000 est le facteur utilisé pour exprimer le résultat en mg/kg ;

P est le poids en grammes d'huile utilisée ;

$\text{RRF}_{\text{sir/tir}}$ est le coefficient de multiplication pour exprimer le résultat final en tyrosol ;

P ac. syr. est le poids en milligrammes d'acide syringique utilisé comme étalon interne dans 1 ml de solution ajouté à l'échantillon.

Tableau 1 Identification des pics des biophénols. Les valeurs maximum d'absorption en UV (max UV abs) et les temps de rétention correspondants (RRT)* sont indiqués.

Pic N°	Biophénols	RRT*	max UV abs. nm
1	Hydroxytyrosol	0,62	230-280
2	Tyrosol	0,80	230-275
3	Acide vanillique	0,96	260
4	Acide caféique	0,99	325
5	acide syringique (étalon interne)	1,00	280
6	Vanilline	1,10	310
7	Acide para-coumarique	1,12	310
8	Hydroxytyrosolacétate	1,20	232-285
9	Acide férulique	1,26	325
10	Acide ortho-coumarique	1,31	325
11;11a	Aglicone Decarboxyméthyleuropéine forme dialdéhydrique oxydée	-	235-280
12	Aglicone Decarboxyméthyleuropéine forme dialdéhydrique	1,45	235-280
13	Oleuropéine	1,48	230-280
14	Aglicone oleuropéine forme dialdéhydrique	1,52	235-280
15	Tyrosilacétate	1,54	230-280
16;16a	Aglicone Décarboxyméthyligstroside forme dialdéhydrique oxydée	1,63	235-275
17	Aglicone Décarboxyméthyligstroside forme dialdéhydrique	1,65	235-275
18	Pinoresinol, 1 acétose-pinorésinol	1,69	232-280
19	Acide cinnamique	1,73	270
20	Aglicone Ligstroside forme dialdéhydrique	1,74	235-275
21;21a;21b	Aglicone oleuropéine forme aldéhydrique et hydroxylique oxydée	-	235-280
22	Lutéoline	1,79	255-350
23	Aglicone oleuropéine forme aldéhydrique et hydroxylique	1,87	235-280
24;24a;24b	Aglicone Ligstroside forme aldéhydrique et hydroxylique oxydée	-	235-275
25	Apigénine	1,98	230-270-340
26	Méthyl-lutéoline	-	255-350
27	Aglicone Ligstroside forme aldéhydrique et hydroxylique	2,03	235-275

(*) La valeur du temps de rétention correspondant est calculée par rapport au temps de rétention de l'acide syringique. L'identification a été effectuée par HPLC-MS.

7

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai devra mentionner les informations suivantes :

- La référence de cette méthode.
- Les résultats de l'essai exprimés en mg/kg d'huile (sans décimale).
- La valeur de RRF utilisée pour les calculs.
- Tout écart par rapport à cette méthode, avec l'accord entre les parties concernées ou pour toute autre raison.
- Les coordonnées du laboratoire, la date à laquelle l'essai a été exécuté et la signature du superviseur de l'essai.

VALEURS DE PRÉCISION

1. Analyse des résultats de l'essai interlaboratoires

Les marges de précision de la méthode sont indiquées dans le tableau ci-joint.

L'essai collaboratif proposé par le Secrétariat exécutif en 2008 aux laboratoires agréés par le Conseil oléicole international à cette date, a été réalisé par 17 laboratoires de 8 pays.

échantillon A – Huile d'olive vierge extra (Italie)
échantillon B - Huile d'olive vierge extra (Espagne)
échantillon C – Huile d'olive vierge extra (Tunisie)
échantillon D – Huile d'olive vierge extra (Slovénie)
échantillon E – Huile d'olive vierge extra (Grèce)
échantillon R – Huile d'olive vierge extra (Italie)

L'analyse statistique des résultats de cet essai interlaboratoires a été réalisée conformément aux dispositions de la norme internationale ISO 5725.

Exactitude (justesse et fidélité) des méthodes d'évaluation et des résultats

L'examen des valeurs aberrantes (outliers) a été effectué au moyen des tests de Cochran et Grubbs sur les résultats des laboratoires pour toutes les déterminations (réplicats a et b).

Légende :

n	est le nombre de laboratoire ayant participé à l'essai
outliers	est le nombre de laboratoires présentant des résultats aberrants
mean	est la moyenne des résultats acceptés
r	est la 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
Sr	est l'écart type de la répétabilité
RSDr	est le coefficient de variation de la répétabilité ($Sr \times 100 / \text{mean}$)
R	est la 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
SR	est l'écart type de la reproductibilité
RSD _R	est le coefficient de variation de la reproductibilité ($SR \times 100 / \text{mean}$)
Ho _R	est la valeur de HORRAT pour la reproductibilité, $[RSD_{R \text{ réel}} / RSD_{R \text{ théor.}}] = 2^{(1-0.5 \log C)}$ et C est la concentration du composé exprimé à la puissance 10 (équation de Horwitz)

Marges de précision des biophénols totaux (mg/1 000 g)

	échantillon	échantillon	échantillon	échantillon	échantillon	échantillon
	A	B	C	D	E	R
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Mean	694	573	153	343	297	301
N	17	17	17	17	17	17
Outliers	3	3	1	2	2	2
non-outlier	14	14	16	15	15	15
tests number	28	28	32	30	30	30
r	29	36	18	24	22	17
S_r	10,4	12,7	6,4	8,7	7,7	6,2
RSD_r(%)	2	2	4	3	3	2
R	101	84	60	63	77	32
S_R	36,0	29,9	21,3	22,4	27,5	11,5
RSD_R(%)	5	5	14	7	9	4
HO_R	0,9	0,8	1,9	1,0	1,4	0,6

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