



MÉTHODE D'ANALYSE

DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION ET DU CONTENU EN STÉROLS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE

1. OBJET

La méthode décrit le procédé de détermination du contenu en stérols, individuels et totaux, des matières grasses.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La matière grasse, additionnée d' α -cholestanol comme étalon interne, est saponifiée avec de l'hydroxyde de potassium en solution éthanolique, puis l'insaponifiable est extrait avec de l'éther éthylique. La fraction stérolique est séparée de l'extrait insaponifiable par chromatographie sur plaque de gel de silice basique; les stérols récupérés dans le gel de silice sont transformés en triméthylsilyléthers et analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

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. Équipement complet pour chromatographie en couche mince avec plaques de verre de 20 x 20 cm.
- 3.5. Lampe à lumière ultraviolette, de longueur d'onde de 366 ou 254 nm.
- 3.6. Microseringues de 100 μ l et 500 μ l.
- 3.7. Ampoule cylindrique filtrante à filtre poreux G 3 (porosité 15 à 40 μ m) de 2 cm de diamètre environ et d'environ 5 cm de hauteur, avec attache appropriée pour filtration sous vide et embout rodé mâle 12/21.

- 3.8. Fiole à vide de 50 ml avec embout rodé femelle 12/21 adaptable à l'ampoule filtrante (3.7.).
- 3.9.  prouvette à fond conique, de 10 ml, avec bouchon hermétique.
- 3.10. Appareil de chromatographie en phase gazeuse, approprié au fonctionnement avec colonne capillaire, constitué de:
 - 3.10.1. Enceinte thermostatée pour la colonne, permettant de maintenir la température désirée avec une précision de # 1 C.
 - 3.10.2. Ensemble d'injection thermor glable avec insert en verre persilanis  et diviseur.
 - 3.10.3. Détecteur à ionisation de flamme et électromètre.
 - 3.10.4. Enregistreur-intégrateur approprié au fonctionnement de l'électromètre (3.10.3), dont le temps de réponse n'est pas supérieur à 1 seconde et la vitesse de déroulement du papier est variable.
- 3.11. Colonne capillaire en verre ou en silice fondue, de 20   30 m de long, de 0,25 à 0,32 mm de diamètre intérieur, recouverte intérieurement de phase stationnaire SE-52 ou SE-54 ou équivalent, avec une épaisseur comprise entre 0,10 et 0,30  m.
- 3.12. Microseringue pour chromatographie en phase gazeuse de 10  l avec aiguille cémentée.

4. RÉACTIFS

- 4.1. Hydroxyde de potassium, solution éthanolique environ 2 N: dissoudre, tout en refroidissant, 130 g d'hydroxyde de potassium (titre minimum 85%) dans 200 ml d'eau distillée, puis compléter à un litre avec de l'éthanol. Conserver la solution dans des bouteilles de verre opaque bien bouchées ( thanol 95% V/V).
- 4.2.  ther éthylrique pur, pour analyse.
- 4.3. Sulfate de sodium anhydre pur, pour analyse.
- 4.4. Plaques de verre recouvertes de gel de silice sans indicateur de fluorescence, de 0,25 mm d'épaisseur (elles sont disponibles dans le commerce d j   prêtes à l'emploi).
- 4.5. Hydroxyde de potassium, solution éthanolique 0,2 N: dissoudre 13 g d'hydroxyde de potassium dans 20 ml d'eau distillée, puis compléter à un litre avec de l'éthanol.
- 4.6. Toluène, pour chromatographie (5.2.2).
- 4.7. Acétone, pour chromatographie (5.2.2).

- 4.8. Hexane pour chromatographie (5.2.2.).
- 4.9. Éther éthylique, pour chromatographie (5.2.2.).
- 4.10. Chloroforme pur, pour analyse (5.2.2.).
- 4.11. Solution de référence pour la chromatographie sur plaque: cholestérol ou phytostérols, solution à 5% dans le chloroforme.
- 4.12. Dichloro-2'-7'fluorescéine, solution éthanolique à 0,2%, rendue légèrement basique par addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique 2 N d'hydroxyde de potassium.
- 4.13. Pyridine anhydre, pour chromatographie.
- 4.14. Hexaméthylidisilazane.
- 4.15. Triméthylchlorosilane.
- 4.16. Solutions échantillon des triméthylsilyléthers de stérols: à préparer au moment de l'emploi à partir des stérols obtenus des huiles les contenant.
- 4.17. α -cholestanol, solution à 0,2% (m/V) dans le chloroforme (étalon interne).
- 4.18. Gaz vecteur: hydrogène ou hélium pur, pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.19. Gaz auxiliaires:
 - hydrogène ou hélium pur, pour chromatographie en phase gazeuse;
 - air pur, pour chromatographie en phase gazeuse.

5. PROCÉDÉ

5.1. Préparation de l'insaponifiable

- 5.1.1. Introduire dans le ballon de 250 ml, au moyen de la microseringue de 500 μ l, la solution d' α -cholestanol à 0,2% dans le chloroforme (4.17.) qui doit contenir une quantité d' α -cholestanol correspondant à environ 10% des stérols contenus dans l'aliquote d'échantillon à prélever pour la détermination. Par exemple, pour 5 g d'échantillon, il faut ajouter 500 μ l de la solution d' α -cholestanol à 0,2% s'il s'agit d'un échantillon d'huile d'olive et 1.500 μ l s'il s'agit d'huile de graines ou d'huile de grignons d'olive.

Évaporer sous courant d'azote jusqu'à dessiccation, puis peser exactement 5 g d'échantillon sec et filtré dans le même ballon.

Dans le cas d'huiles et de graisses animales ou végétales contenant des quantités considérables de cholestérol, un pic ayant un temps de rétention identique à celui du cholestanol peut être présent. Dans de tels cas, il faut analyser la fraction stérolique en duplicata, avec et sans étalon interne.

5.1.2. Ajouter 50 ml de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 2 N, mettre en marche le réfrigérant à reflux, chauffer au bain-marie jusqu'à légère ébullition tout en maintenant une agitation énergique jusqu'à ce que la saponification se soit produite (la solution devient limpide). Continuer à chauffer pendant 20 minutes, puis ajouter 50 ml d'eau distillée que l'on fait descendre du haut du réfrigérant, débrancher le réfrigérant et refroidir le ballon à environ 30°C.

5.1.3. Transvaser le contenu du ballon de façon quantitative, dans une ampoule à décanter de 500 ml, à l'aide de plusieurs lavages à l'eau distillée, en utilisant au total environ 50 ml. Ajouter environ 80 ml d'éther éthylique, agiter énergiquement durant environ 30 secondes et laisser décanter (Note 1).

Soutirer la phase aqueuse inférieure en la recueillant dans une autre ampoule à décanter. Faire encore deux extractions sur la phase hydroalcoolique, selon les mêmes modalités, en utilisant chaque fois 60 à 70 ml d'éther éthylique.

Note 1: Des émulsions éventuelles peuvent être éliminées en ajoutant une petite quantité d'alcool éthylique ou méthylique à l'aide d'un vaporisateur.

5.1.4. Réunir les extraits étherés dans une seule ampoule à décanter et laver à l'eau distillée (50 ml chaque fois) jusqu'à réaction neutre de l'eau de lavage.

Après élimination de l'eau de lavage, sécher avec du sulfate de sodium anhydre et filtrer, sur sulfate de sodium anhydre, dans un ballon de 250 ml pesé au préalable, en lavant l'ampoule et le filtre avec de petites quantités d'éther éthylique.

5.1.5. Distiller l'éther jusqu'à ce qu'il en reste quelques ml, puis porter à sec sous un léger vide ou sous courant d'azote, compléter le séchage à l'étuve à 100°C durant un quart d'heure environ et peser après refroidissement dans un dessiccateur.

5.2. Séparation de la fraction stérolique

5.2.1. Préparation des plaques basiques: immerger les plaques au gel de silice (4.4.) complètement dans la solution éthanolique 0,2 N d'hydroxyde de potassium (4.5.) durant 10 secondes; laisser sécher les plaques sous hotte pendant deux heures et les mettre dans l'étuve à 100°C pendant une heure.

Retirer de l'étuve et conserver dans un dessiccateur au chlorure de calcium jusqu'au moment de l'emploi (les plaques ainsi traitées doivent être employées dans les quinze jours).

Note 2: Si des plaques de gel de silice basiques sont utilisées pour la séparation de la fraction stérolique, il n'est plus nécessaire de traiter l'insaponifiable avec l'alumine. De cette manière, tous les composés de nature acide (acides gras et autres) sont retenus sur la ligne de dépôt. On obtient ainsi la bande des stérols nettement séparée de la bande des alcools aliphatiques et triterpéniques.

5.2.2. Introduire dans la cuve de développement un mélange toluène-acétone 95/5 (V/V) jusqu'à une hauteur d'environ 1 cm. On peut utiliser à la place un mélange hexane-éther éthylique 65/35 (V/V). Fermer la cuve à l'aide du couvercle approprié et laisser ainsi pendant une demi-heure au moins, de façon à ce que l'équilibre liquide/vapeur s'établisse. Il est possible de fixer sur les surfaces intérieures de la cuve des bandes de papier filtre qui plongent 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.

5.2.3. Préparer une solution à 5% environ d'insaponifiable (5.1.5.) dans le chloroforme et, avec la microseringue de 100 µl, déposer sur la plaque chromatographique (5.2.1.), à 2 cm environ d'un bord, 0,3 ml de ladite solution en une ligne continue aussi fine et uniforme que possible. À la hauteur de cette ligne, déposer, à un des bords de la plaque, 2 à 3 µl de la solution de référence des stérols (4.11), afin de pouvoir identifier la bande des stérols après développement.

5.2.4. Mettre la plaque dans la cuve de développement, préparée comme décrit en 5.2.2. La température ambiante doit être maintenue entre 15 et 20°C. Fermer aussitôt la cuve avec le couvercle et laisser éluer jusqu'à ce que le front du solvant arrive à environ 1 cm du bord supérieur de la plaque. Enlever ensuite la plaque de la cuve de développement et évaporer le solvant sous courant d'air chaud ou bien en laissant la plaque sous hotte pendant quelque temps.

5.2.5. Vaporiser légèrement et uniformément la plaque avec la solution de dichloro-2'-7'fluorescéine. En observant la plaque sous lumière UV, la bande des stérols peut être identifiée par alignement avec la tache obtenue à l'aide de la solution de référence; délimiter la bande avec un crayon noir le long des bords de la fluorescence.

5.2.6. Racler avec une spatule métallique le gel de silice compris dans la zone délimitée. Le matériau retiré, finement broyé, est introduit dans l'ampoule filtrante (3.7); ajouter 10 ml de chloroforme chaud, mélanger soigneusement avec la spatule métallique et filtrer à l'aide du vide, puis recueillir le filtrat dans la fiole (3.8) reliée à l'ampoule filtrante.

Laver le résidu dans l'ampoule par trois fois à l'éther éthylique (environ 10 ml chaque fois) et recueillir toujours le filtrat dans la même fiole adaptée à l'ampoule filtrante. Évaporer le filtrat jusqu'à un volume d'environ 4 à 5 ml, transférer la solution résiduelle dans l'éprouvette de 10 ml (3.9) pesée au préalable, évaporer jusqu'à séchage en chauffant légèrement sous léger courant d'azote, reprendre avec quelques gouttes d'acétone, évaporer de nouveau jusqu'à séchage, mettre 10 minutes environ à l'étuve à 105°C, puis laisser refroidir dans le dessiccateur et peser.

Le résidu contenu dans l'éprouvette est constitué de la fraction stérolique.

5.3. Préparation des triméthylsilyléthers

5.3.1. Ajouter, dans l'éprouvette contenant la fraction stérolique, le réactif de silylation, constitué par un mélange de pyridine-hexaméthylidisilazane-triméthylchlorosilane 9/3/1 (V/V/V) (Note 4) dans une proportion de 50 µl par milligramme de stérols, en évitant toute absorption d'humidité (Note 5).

Note 4: Des solutions prêtes à l'emploi sont disponibles dans le commerce; d'autres réactifs silanisants sont également disponibles, tels que, par exemple, le bis-triméthylsilyltrifluoracétamide + 1% de triméthylchlorosilane à diluer dans un volume égal de pyridine anhydre.

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

Note 5: 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.

5.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

5.4.1. Opérations préliminaires, conditionnement de la colonne.

5.4.1.1. Installer la colonne 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 généraux du système de chromatographie en phase gazeuse (étanchéité du circuit des gaz, efficacité du détecteur, efficacité du système diviseur et du système d'enregistrement, etc.).

5.4.1.2. 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 sous tension l'appareil et commencer un chauffage graduel jusqu'à atteindre une température d'au moins 20°C supérieure à celle de travail (Note 6). Maintenir cette température pendant au moins deux heures, puis porter l'ensemble aux conditions de fonctionnement (régulation du flux gazeux du système diviseur, allumage de la flamme, jonction avec l'enregistreur électronique, régulation de la température du four, du détecteur et de l'injecteur, etc.) et enregistrer le signal à une sensibilité d'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 une étanchéité imparfaite des connexions de la colonne; une dérive positive indique un conditionnement insuffisant de la colonne.

Note 6: La température de conditionnement doit être toujours inférieure d'au moins 20°C à la température maximale prévue pour la phase stationnaire utilisée.

5.4.2. Choix des conditions opératoires

5.4.2.1. En règle générale, les conditions opératoires sont les suivantes:

- température de la colonne: $260^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
- température de l'injecteur: 280°C,
- température du détecteur: 290°C,
- vitesse linéaire du gaz vecteur: hélium, 20 à 35 cm/s; hydrogène, 30 à 50 cm/s,
- rapport de division: de 1/50 à 1/100,
- sensibilité instrumentale: de 4 à 16 fois l'atténuation minimale,
- sensibilité d'enregistrement: 1 à 2 mV pleine échelle,
- vitesse de déroulement du papier: 30 à 60 cm/heure,
- quantité de substance injectée: 0,5 à 1 µl de solution de TMSE.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse de façon à obtenir des chromatogrammes satisfaisant aux conditions suivantes:

- le temps de rétention du β -sitostérol doit être de 20 ± 5 minutes,
- le pic du campestérol doit être: pour l'huile d'olive (contenu moyen 3%) $15 \pm 5\%$ de l'échelle de l'enregistreur, pour l'huile de soja (contenu moyen 20%) $80 \pm 10\%$ de l'échelle,
- il doit y avoir séparation de tous les stérols présents; il est nécessaire que les pics soient 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 en utilisant la perpendiculaire.

5.4.3. Exécution de l'analyse:

5.4.3.1. Prélever, avec la microsiringue de 10 μ l, 1 μ l d'hexane, aspirer 0,5 μ l d'air et successivement de 0,5 à 1 μ l de la solution de l'échantillon; tirer encore le piston de la siringue de façon à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille au travers de la membrane de l'injecteur et, après 1 à 2 secondes, injecter rapidement et extraire ensuite l'aiguille lentement, au bout de 5 secondes environ.

5.4.3.2. Procéder à l'enregistrement jusqu'à élution complète des TMSE des stérols présents.

La ligne de base doit toujours être en accord avec les conditions requises (5.4.1.2.).

5.4.4. 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 stérols, analysés dans les mêmes conditions.

Les stérols sont élués dans l'ordre suivant: cholestérol, brassicastérol, 24-méthylène-cholestérol, campestérol, campestanol, stigmastérol, Δ 7-campestérol, Δ 5,23-stigmastadiérol, clérostérol, β -sitostérol, sitostanol, Δ 5-avénastérol, Δ 5,24-stigmastadiérol, Δ 7-stigmastérol, Δ 7-avénastérol.

Dans le tableau 1 sont consignés les temps de rétention relatifs au β -sitostérol pour les colonnes SE-52 et SE-54.

Les figures 1 et 2 illustrent les chromatogrammes typiques de quelques huiles.

5.4.5. Évaluation quantitative

5.4.5.1. Procéder, avec l'intégrateur, au calcul des aires des pics de l' α -cholestanol et des stérols. Ne pas considérer les pics de composants éventuels non compris parmi ceux énumérés dans le tableau 1. Le coefficient de réponse CPG de l' α -cholestanol s'entend égal à 1.

5.4.5.2. Calculer le contenu de chaque stérol individuel, en mg/kg de matière grasse, comme suit:

$$\text{stérol x} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

où:

A_x = aire du pic du stérol x, en millimètres carrés;

A_s = aire du pic d' α -cholestanol, en millimètres carrés;

m_s = masse, en milligrammes, d' α -cholestanol ajouté;

m = masse, en grammes, de l'échantillon prélevé pour la détermination.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

6.1. Les contenus des stérols individuels sont exprimés en mg/kg de matière grasse et leur somme comme "stérols totaux".

6.2. Calculer le pourcentage de chaque stérol individuel à partir du rapport entre l'aire du pic correspondant et la somme des aires des pics des stérols.

$$\% \text{ du stérol x} = \frac{A_x}{\Sigma A} \cdot 1000$$

où:

A_x = aire du pic du stérol x;

ΣA = somme des aires de tous les pics.

APPENDICE

Détermination de la vitesse linéaire du gaz

Dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, réglé aux conditions opératoires normales, injecter 1 à 3 μl de méthane (ou propane) et chronométrer le temps employé par le gaz pour parcourir la colonne, entre le moment de l'injection et celui de la sortie du pic (t_M).

La vitesse linéaire en cm/s est donnée par L/t_M , où L est la longueur de la colonne en centimètres et t_M le temps chronométré en secondes.

TABLEAU 1

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 -cholestane-3 β -ol	0,68	0,64
3	brassicastérol	(24S)-24-méthyl- Δ -5,22-cholestadiène-3 β -ol	0,73	0,71
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-cholestane-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	(24R,S)-24-éthyl- Δ -5,23-cholestadiène-3 β -ol	0,95	0,95
10	clérostérol	(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-avénastérol	(24Z)-24-éthylidène- Δ 5-cholestène-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5-24-stigmastadiénol	(24R,S)-24-éthyl- Δ -5,24-cholestadiène-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastérol	(24R,S)-24-éthyl- Δ -7-cholestène-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avénastérol	(24Z)-24-éthylidène- Δ -7-cholestène-3 β -ol	1,16	1,16

FIGURE 1

**CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DE LA FRACTION
STÉROLIQUE D'UNE HUILE D'OLIVE BRUTE**

(avec ajout d'étalon interne)

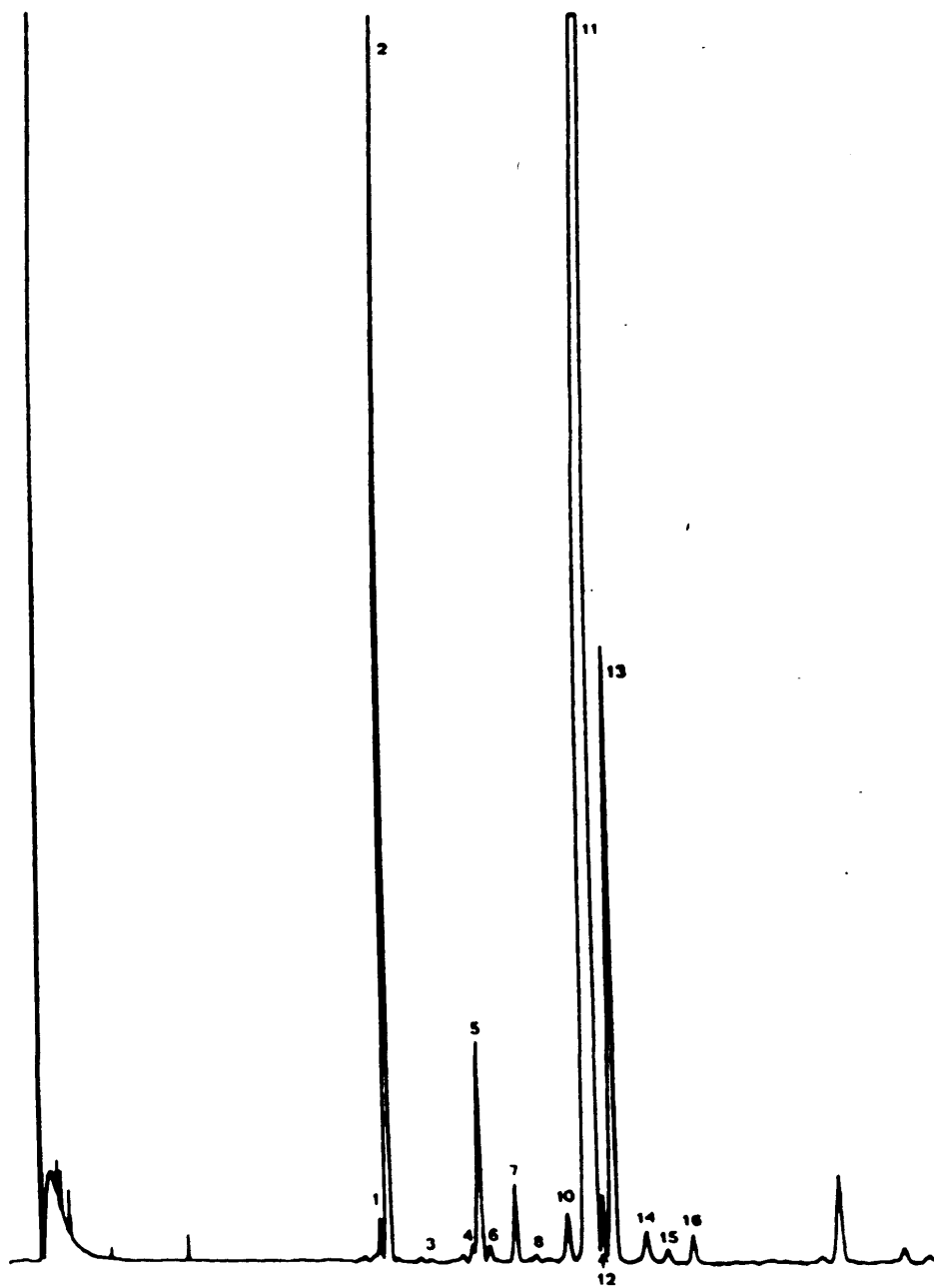
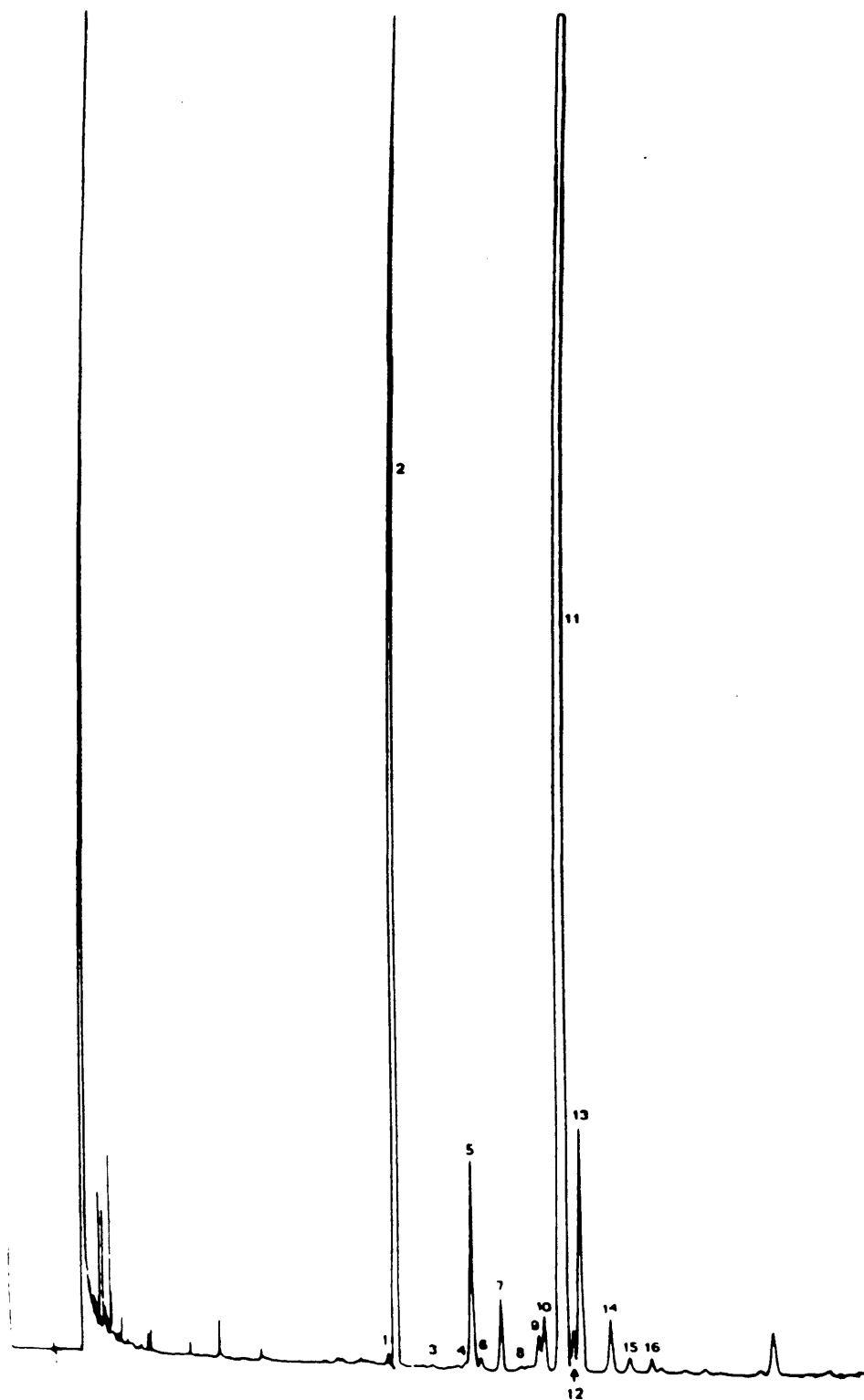


FIGURE 2

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DE LA FRACTION STÉROLIQUE
D'UNE HUILE D'OLIVE RAFFINÉE
(avec ajout d'étalon interne)



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 de:

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

R Valeur au dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels obtenus à l'aide de la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant un appareillage différent

S_R Écart-type de reproductibilité

RSD_R (%) Coefficient de variation de reproductibilité ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Teneur en stérols totaux (mg/kg)

	A	B	C	D	E
n	19	19	19	19	19
outliers	5	3	4	5	3
mean	1547	1720	1618	1498	1578
r	85.59	75.06	57.00	52.32	60.83
S_r	30.57	26.81	20.35	18.68	21.72
RSD_r (%)	1.98	1.56	1.26	1.25	1.38
R	95.45	181.85	156.85	164.25	155.08
S_R	34.09	64.94	56.02	58.66	55.38
RSD_R(%)	2.20	3.78	3.46	3.92	3.51

Composition en stérols (%) - Cholestérol

	A	B	C	D	E
n	17	17	17	17	17
outliers	2	2	4	5	3
mean	0.18	0.19	0.16	0.14	0.16
r	0.09	0.09	0.04	0.06	0.04
S_r	0.03	0.03	0.01	0.02	0.01
RSD_r (%)	19.41	17.43	11.11	17.55	10.53
R	0.21	0.23	0.13	0.13	0.15
S_R	0.07	0.08	0.05	0.04	0.05
RSD_R(%)	43.43	42.94	31.82	35.28	34.15

- Brassicastérol

	A	B	C	D	E
n	17	17	17	17	17
outliers	4	1	0	1	2
mean	0	0.01	0.01	0.02	0.02
r	-	0.01	0.02	0.03	0.01
S_r	-	0.00	0.01	0.01	0
RSD_r (%)	-	75.59 _(not sig.)	83.24 _(not sig.)	73.17 _(not sig.)	30.79 _(not sig.)
R	-	0.05	0.05	0.05	0.06
S_R	-	0.01	0.01	0.01	0.02
RSD_R(%)	-	209.76 _(not sig.)	166.95 _(not sig.)	115.48 _(not sig.)	116.35 _(not sig.)

- Campestérol

	A	B	C	D	E
n	15	15	15	15	15
outliers	0	0	0	0	0
mean	4.05	4.95	3.99	3.95	4.29
r	0.14	0.20	0.20	0.15	0.12
S_r	0.05	0.07	0.07	0.05	0.04
RSD_r (%)	1.29	1.45	1.82	1.43	1.03
R	0.26	0.34	0.27	0.19	0.29
S_R	0.09	0.12	0.09	0.07	0.10
RSD_R(%)	2.30	2.51	2.49	1.79	2.42

-Stigmastérol

	A	B	C	D	E
n	15	15	15	15	15
outliers	1	0	0	1	0
mean	1.03	2.27	1.06	1.39	2.35
r	0.05	0.12	0.09	0.08	0.15
S_r	0.02	0.04	0.03	0.03	0.05
RSD_r (%)	1.90	1.94	30.6	2.16	2.32
R	0.11	0.19	0.13	0.11	0.20
S_R	0.04	0.07	0.04	0.04	0.07
RSD_R(%)	3.87	3.13	4.64	2.93	3.12

- Delta- 7- stigmastérol

	A	B	C	D	E
n	15	15	15	15	15
outliers	0	0	0	1	0
mean	0.14	2.25	0.19	0.51	0.56
r	0.09	0.16	0.08	0.09	0.08
S_r	0.03	0.06	0.02	0.03	0.03
RSD_r (%)	24.67	2.69	15.30	6.37	5.32
R	0.12	0.26	0.11	0.11	0.13
S_R	0.04	0.09	0.04	0.04	0.04
RSD_R(%)	30.66	4.25	22.57	7.89	8.48

- Bêta-sitostérol apparent

	A	B	C	D	E
n	15	15	15	15	15
outliers	0	1	0	0	0
mean	93.88	88.7	93.93	93.23	91.63
r	0.27	0.38	0.36	0.29	0.33
S_r	0.10	0.13	0.13	0.10	0.12
RSD_r (%)	0.11	0.15	0.14	0.11	0.13
R	0.87	0.91	0.70	0.90	0.89
S_R	0.31	0.32	0.25	0.32	0.32
RSD_R(%)	0.33	0.37	0.27	0.35	0.35

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