



MÉTHODE D'ANALYSE

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

1. OBJET

La méthode décrit le procédé de détermination du contenu en stérols et en dialcools triterpéniques, individuels et totaux, des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive.

2. PRINCIPE

Les huiles, additionnées d' α -cholestanol comme étalon interne, sont saponifiées avec de l'hydroxyde de potassium en solution éthanolique, puis l'insaponifiable est extrait avec de l'éther éthylique.

La fraction stérolique et des dialcools triterpéniques est séparée de l'extrait insaponifiable par chromatographie sur couche mince sur plaque de gel de silice. Les fractions récupérées dans le gel de silice sont transformées en triméthylsilyléthers et analysées par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

3. MATÉRIEL

L'équipement normal de laboratoire et en particulier le matériel suivant :

- 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. Émetteur ultraviolet longueur d'onde 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 - 40 μm) de 2 cm de diamètre environ et de 5 cm de hauteur, appropriée à la filtration sous vide avec embout rodé mâle.
- 3.8. Fiole à vide de 50 ml avec embout rodé femelle adaptable à l'ampoule filtrante (3.7.).
- 3.9. Tube à fond conique, de 10 ml, avec bouchon hermétique en verre.
- 3.10 Appareil de chromatographie en phase gazeuse approprié au fonctionnement avec colonne capillaire, avec injecteur diviseur, constitué de :
 - 3.10.1. Enceinte thermostatée pour la colonne, permettant de maintenir la température désirée avec une précision de $\pm 1^\circ \text{C}$;
 - 3.10.2. Ensemble d'injection thermoréglable avec insert en verre persilanisé et diviseur ;
 - 3.10.3. Détecteur à ionisation de flamme (FID) ;
 - 3.10.4. Système d'acquisition de données approprié au fonctionnement avec le FID (3.10.3) permettant l'intégration manuelle ;
- 3.11. 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 .
- 3.12. Microseringue pour chromatographie en phase gazeuse de 10 μl avec aiguille rigide adaptée à l'injecteur diviseur.
- 3.13. Dessiccateur contenant du chlorure de calcium.

4. RÉACTIFS

- 4.1. Hydroxyde de potassium de titre 85 % minimum.
- 4.2. Solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, environ 2 N.

Dissoudre 130 g d'hydroxyde de potassium (4.1) en refroidissant dans 200 ml d'eau distillée puis compléter jusqu'à 1 litre avec l'éthanol (4.11). Conserver la solution dans des bouteilles en verre opaque bien fermées et conserver maximum 2 jours.

- 4.3. Éther éthylique pour analyse.
- 4.4. Solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, environ 0.2 N.

Dissoudre 13 g d'hydroxyde de potassium (4.1) en refroidissant dans 20 ml d'eau distillée puis compléter jusqu'à 1 litre avec l'éthanol (4.11).

- 4.5. Sulfate de sodium anhydre pour analyse.
- 4.6. Plaques de verre recouvertes de gel de silice sans indicateur de fluorescence de 0,25 mm d'épaisseur (disponibles dans le commerce).
- 4.7. Toluène, pour chromatographie.
- 4.8. Acétone, pour chromatographie.
- 4.9. n-Hexane, pour chromatographie.
- 4.10. Éther éthylique pour chromatographie.
- 4.11. Éthanol pour analyse.
- 4.12. Acétate d'éthyle pour analyse.
- 4.13. Solution de référence pour la chromatographie sur plaque: cholestérol ou phytostérols, et solution d'érythrodiol 5 % dans l'acétate d'éthyle (4.12).
- 4.14. 2,7-dichlorofluorescéine, 0,2 % dans solution éthanolique rendue légèrement basique en ajoutant quelques gouttes d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2N (4.2).
- 4.15. Pyridine anhydre, pour chromatographie (voir Note 5).
- 4.16. Hexaméthylidisilazane pour analyse.
- 4.17. Triméthylchlorosilane pour analyse.
- 4.18. 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.
- 4.19. α -cholestanol, pureté supérieure à 99 % (la pureté doit être vérifiée par analyse GC).
- 4.20. α -cholestanol solution étalon interne, solution 0,2 % (m/V) dans l'acétate d'éthyle (4.12).
- 4.21. Solution de phénolphthaléine, 10 g/L dans l'éthanol (4.11).
- 4.22. Gaz vecteur : hydrogène ou hélium, pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.23. Gaz auxiliaires : hydrogène, hélium, azote et air, pour chromatographie.
- 4.24. Mélange de n-hexane (4.9)/éther éthylique (4.10) 65:35 (V/V).
- 4.25. Réactif de silylation composé d'un mélange 9:3:1 (V/V/V) de pyridine/hexaméthylidisilazane/triméthylchlorosilane.

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. Préparation de l'insaponifiable

5.1.1. Au moyen de la microseringue de 500 µl (3.6), introduire dans le ballon de 250 ml (3.1) un volume d'étalon interne de α -cholestanol (4.20) contenant une quantité de cholestanol correspondant à environ 10 % des stérols contenus dans l'échantillon. Par exemple, pour un échantillon de 5 g d'huile d'olive, ajouter 500 µl de solution de α -cholestanol (4.20) et 1 500 µl 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 $5 \pm 0,01$ 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 cholestanol apparaisse. Le cas échéant, la fraction stérolique devra être analysée en duplicata, avec et sans étalon interne.

5.1.2. Ajouter 50 ml de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 2 N (4.2) et de la pierre ponce. Mettre en marche le réfrigérant à reflux, chauffer au bain-marie jusqu'à légère ébullition. Lorsque la saponification s'est produite (la solution devient limpide), continuer à chauffer pendant 20 minutes, puis verser 50 ml d'eau distillée du haut du réfrigérant. Débrancher le réfrigérant et laisser refroidir le ballon à environ 30° C.

5.1.3. 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 éthylique (4.10) et agiter énergiquement durant environ 60 secondes. 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 éthylique (4.10).

Note 2 : Les émulsions peuvent être éliminées en ajoutant de petites quantités d'éthanol (4.11).

5.1.4. Verser les trois extraits étherés 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 (4.21).

Après élimination de l'eau de lavage, filtrer sur du sulfate de sodium anhydre (4.5) dans un ballon de 250 ml préalablement pesé, en lavant l'ampoule et le filtre avec de petites quantités d'éther éthylique (4.10).

5.1.5. Évaporer le solvant par distillation avec un évaporateur rotatif à 30° C sous vide. Ajouter 5 ml d'acétone et éliminer complètement le solvant volatil sous un léger courant d'air. 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.

5.2. Séparation de la fraction stérolique et des dialcools triterpéniques (érythrodiol + uvaol)

5.2.1. Préparation des plaques basiques : immerger les plaques de gel de silice (4.6) dans environ 4 cm de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0.2 N (4.4) pendant 10 secondes, puis les laisser sécher dans une hotte pendant deux heures avant de les placer dans une étuve à 100° C pendant une heure.

Retirer de l'étuve et placer dans un dessiccateur contenant du chlorure de calcium (3.13) jusqu'au moment de l'emploi (les plaques traitées de cette manière doivent être utilisées dans les 15 jours).

Note 3 : Si des plaques de gel de silice basiques sont utilisées pour la séparation de la fraction stérolique, il n'est pas 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 et la bande des stérols se distingue nettement de la bande des alcools aliphatiques et triterpéniques.

5.2.2. Introduire le mélange hexane/éther éthylique (4.24) (Note 4) 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 4 : Afin d'avoir des conditions d'élution parfaitement reproductibles, le mélange doit être changé à chaque essai. Un solvant n-hexane/éther éthylique 50:50 (V/V) peut également être utilisé.

5.2.3. Préparer une solution à 5 % environ d'insaponifiable (5.1.5.) dans l'acétate d'éthyle (4.12) et, avec la microseringue de 100 µl, déposer 0,3 ml de cette solution en une ligne continue fine et uniforme à l'extrémité inférieure (2 cm) de la plaque chromatographique (5.2.1). À la hauteur de cette ligne, déposer 2 à 3 µl de la solution de référence (4.13) afin de pouvoir identifier la bande des stérols et des dialcools triterpéniques après développement.

5.2.4. Mettre la plaque dans la cuve de développement préparée comme indiqué en 5.2.2. La température ambiante doit être maintenue entre 15 et 20° C (Note 5). 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 5 : Des températures supérieures pourraient détériorer la séparation.

5.2.5. Vaporiser légèrement et uniformément la plaque avec la solution de 2,7-dichlorofluorescéine (4.14) et laisser sécher. Sur la plaque observée sous lumière UV, les

bandes des stérols et des dialcools triterpéniques peuvent être identifiées par alignement avec les taches obtenues à l'aide de la solution de référence (4.13). Indiquer les limites de la bande avec un crayon noir en suivant les bords de la fluorescence (voir figure 3 plaque TLC).

5.2.6. Racler avec une spatule métallique le gel de silice présent dans la zone délimitée. Introduire le matériau retiré, finement broyé, dans l'ampoule filtrante (3.7). Ajouter 10 ml d'acétate d'éthyle chaud (4.12), 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 (4.3) (environ 10 ml chaque fois) et recueillir 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 le tube de 10 ml (3.9) pesé au préalable, évaporer jusqu'à séchage en chauffant légèrement sous léger courant d'azote, reprendre avec quelques gouttes d'acétone (4.8) et évaporer à nouveau jusqu'à séchage.

Le résidu contenu dans le tube est constitué des fractions stérolique et des dialcools triterpéniques.

5.3. Préparation des triméthylsilyléthers (TMSE)

5.3.1. Ajouter, dans le tube contenant la fraction stérolique, le réactif de silylation (4.25) (Note 6) dans une proportion de 50 µl par milligramme de stérols et de dialcools triterpéniques, 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.

5.3.2. Boucher le tube, agiter soigneusement (sans retourner) jusqu'à solubilisation complète des composés. 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 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'hexaméthylidisilazane et le triméthylchlorosilane).

5.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

5.4.1. Opérations préliminaires, conditionnement de la colonne

5.4.1.1. Installer la colonne (3.11) 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 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 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 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 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.

5.4.2. Choix des conditions opératoires

5.4.2.1 Les conditions opératoires à observer sont les suivantes :

- température de la colonne : 260 ± 5 °C ;
- température de l'injecteur : 280 - 300 °C ;
- température du révélateur : 280 - 300 °C ;
- vitesse linéaire du gaz vecteur : hélium, 20 à 35 cm/s ; hydrogène 30 à 50 cm/s ;
- ratio de division : de 1:50 à 1:100 ;
- sensibilité instrumentale : 4 à 16 fois l'atténuation minimale ;
- sensibilité d'enregistrement : 1 à 2 mV pleine échelle ;
- 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 %) 20 ± 5 % de l'échelle de l'enregistreur, pour l'huile de soja (contenu moyen 20 %) 80 ± 10 % de l'échelle ;

- 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.

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 à nouveau le piston de la siringue de façon à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille à travers 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.

Un injecteur automatique peut également être employé.

5.4.3.2. Procéder à l'enregistrement jusqu'à élution complète des TMSE des dialcools triterpéniques 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 et des dialcools triterpéniques, analysés dans les mêmes conditions.

Les stérols sont élués dans l'ordre suivant : cholestérol, 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.

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 au calcul des aires des pics de l' α -cholestanol et des stérols et dialcools triterpéniques 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 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 unité d'intégration.

A_s = aire du pic d' α -cholestanol, en unité d'intégration.

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

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

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

6.1. Les teneurs en stérols individuels sont exprimés en mg/kg de matière grasse et leur somme comme « stérols totaux ».

La composition de chacun des stérols individuels et de l'érythrodiol et uvaol doit être exprimée à une décimale.

La teneur en stérols totaux doit être exprimée sans décimale.

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:

$$\text{stérol } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \cdot 100$$

où :

A_x = aire du pic pour x

ΣA = somme des aires de tous les pics des stérols

6.3. b-sitosterol apparent : $\Delta 5$ -23-stigmastadiénol + clerostérol + β -sitostérol + sitostanol + $\Delta 5$ -avenastérol + $\Delta 5$ -24-stigmastadiénol.

6.4. Calculer le pourcentage d'érythrodiol et uvaol :

$$\text{érythrodiol + uvaol} = \frac{Er. + Uv.}{Er. + Uv. + \Sigma A} \cdot 100$$

où :

ΣA = somme des aires pour le stérol en unités d'intégration.

Er = aire de l'érythrodiol en unités d'intégration.

Uv = aire de l'uvaol en unités d'intégration.

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 (tM).

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

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	Brassicatérol	[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 -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-stigmastérol	[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 1

**CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DE LA FRACTION DES STÉROLS ET DIALCOOLS
TRITERPÉNIQUES D'UNE HUILE D'OLIVE LAMPANTE
(avec étalon interne)**

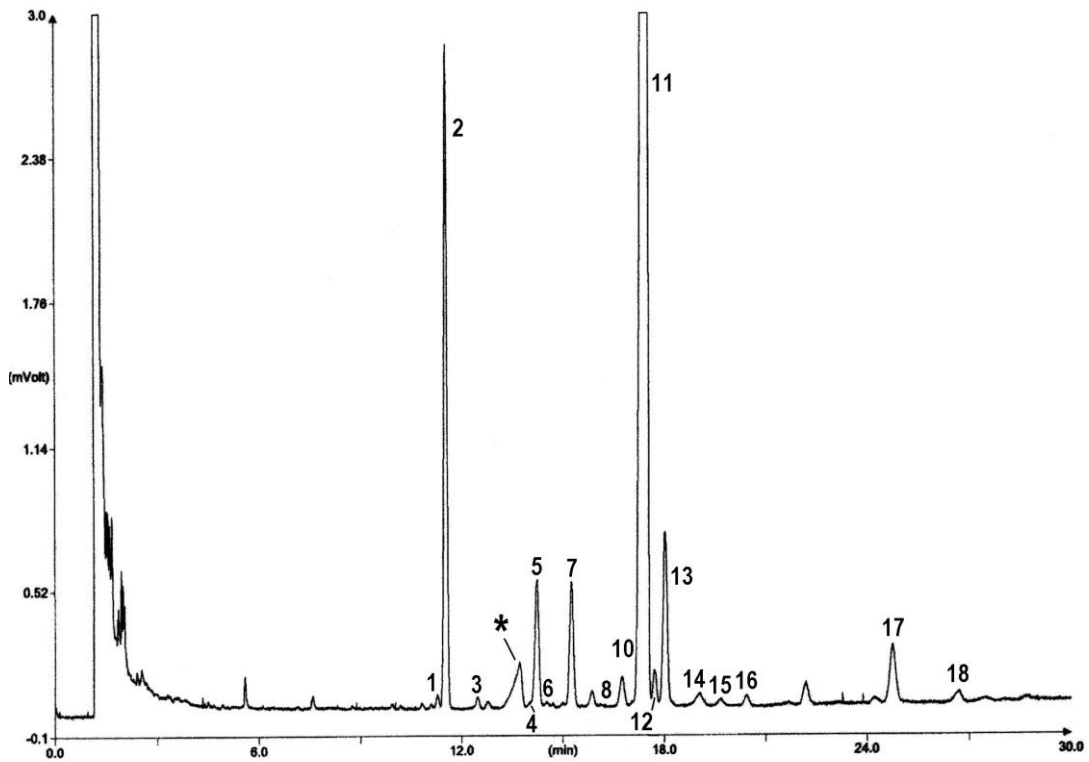


FIGURE 2

**CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DE LA FRACTION DES STÉROLS ET DIALCOOLS
TRITERPÉNIQUES D'UNE HUILE D'OLIVE RAFFINÉE**
(avec étalon interne)

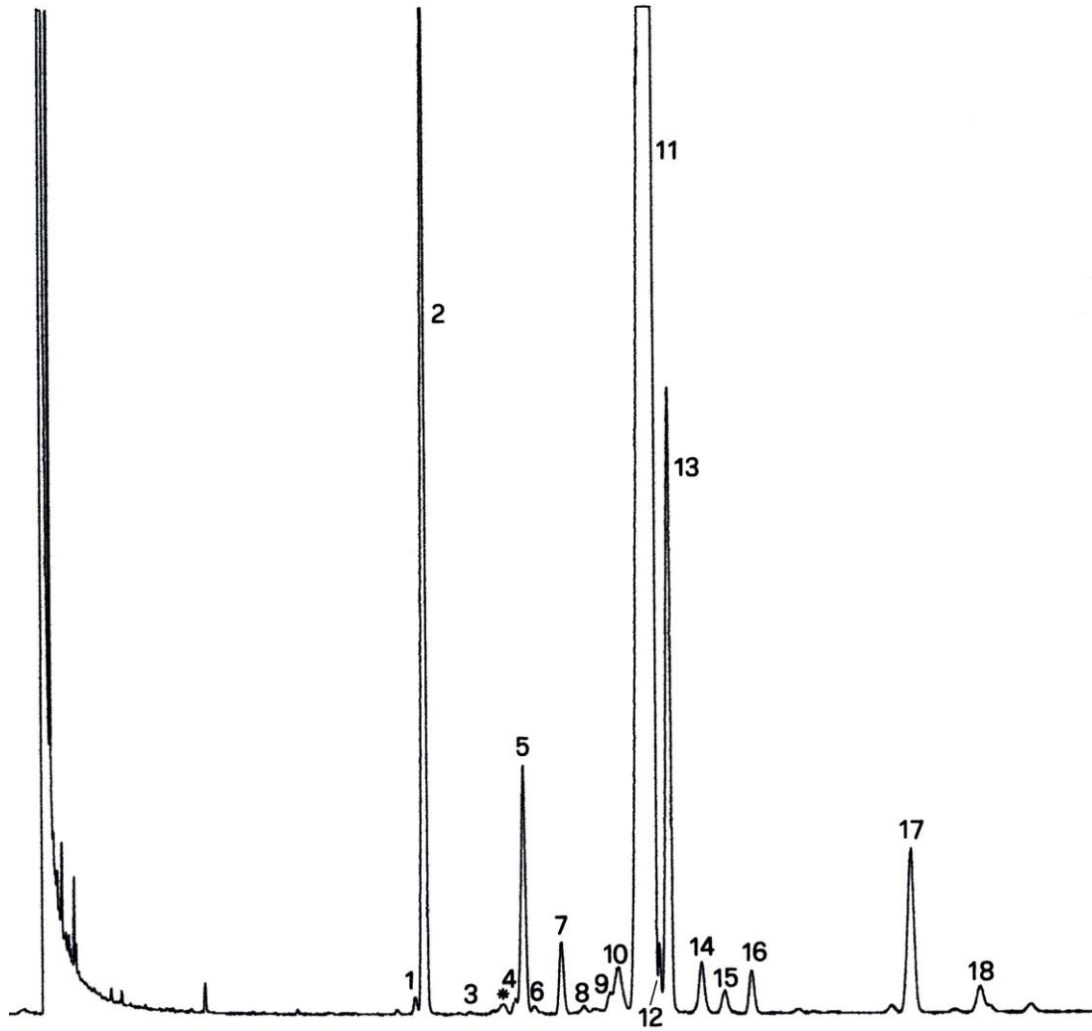
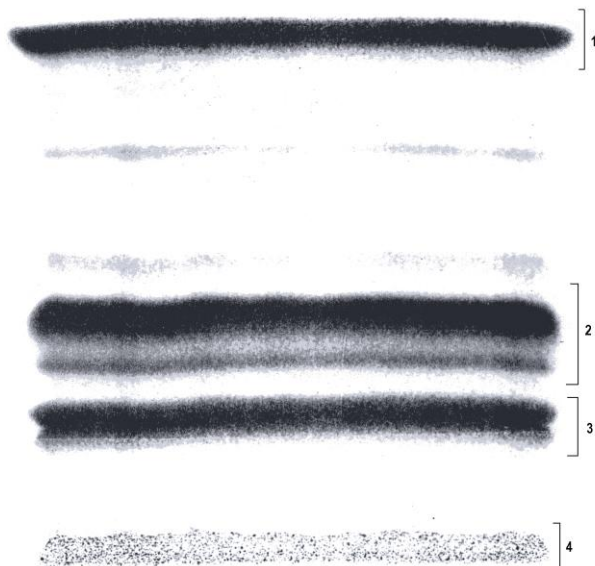


FIGURE 3

Plaque de chromatographie sur couche mince d'une huile de grignons d'olive avec la zone à racler pour la détermination des stérols et des dialcools triterpéniques



Légende :

- 1 – Squalène
- 2 – Alcools triterpéniques et aliphatiques
- 3 – Stérols et dialcools triterpéniques
- 4 – Départ et acides gras libres

MARGES DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE POUR LES STÉROLS

1. Analyse des résultats de l'essai circulaire

Les marges de précision de la méthode figurent dans le tableau ci-après.

L'essai circulaire proposé par le Secrétariat exécutif en 2009 a été réalisé par 19 laboratoires. Il portait sur les cinq échantillons suivants :

- ST-1 Huile de grignons d'olive brute.
- ST-2 Huile de grignons d'olive raffinée.
- ST-3 Huile d'olive vierge extra.
- ST-4 Mélange de 20 % d'huile de tournesol à forte teneur oléique, de 70 % d'huile d'olive vierge extra et de 10 % d'huile de colza.
- ST-5 Mélange de 15 % d'huile de soja et de 85 % d'huile d'olive.

L'analyse statistique des résultats de l'essai circulaire a été réalisée par le Secrétariat exécutif du Conseil oléicole international en suivant 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 au moyen des tests de Cochran et 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_p	nombre de laboratoires participants
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 ($S_R \times 100/\text{mean}$)

Composition stérols

Cholestérol

ÉCHANTILLON	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nombre de laboratoires participants, n_p	19	19	19	19	19
Nombre de laboratoires retenus après élimination des outliers, n_p	19	14	16	18	18
Nombre de résultats des essais dans tous les laboratoires n_t	38	28	32	36	36
Mean (%)	0,13	0,13	0,13	0,16	0,21
Écart-type de répétabilité, s_r	0,024	0,018	0,016	0,025	0,015
Coefficient de variation de répétabilité, $CV(r)$, %	18,8	14,0	12,3	15,1	7,2
Limite de répétabilité, r	0,07	0,05	0,04	0,07	0,04
Écart-type de reproductibilité, s_R	0,041	0,023	0,038	0,047	0,058
Coefficient de variation de reproductibilité, $CV(R)$, %	31,9	17,8	29,5	29,1	27,7
Limite de reproductibilité, R	0,12	0,07	0,11	0,13	0,16

Brassicastérol

ÉCHANTILLON	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nombre de laboratoires participants, n_p	19	19	19	19	19
Nombre de laboratoires retenus après élimination des outliers, n_p	19	15	17	19	18
Nombre de résultats des essais dans tous les laboratoires n_t	38	30	34	38	36
Mean (%)	0,05	0,02	0,000	1,46	0,02
Écart-type de répétabilité, s_r	0,013	0,004	----	0,039	0,007
Coefficient de variation de répétabilité, $CV(r)$, %	25,9	21,1	----	2,7	32,7
Limite de répétabilité, r	0,04	0,01	----	0,11	0,02
Écart-type de reproductibilité, s_R	0,039	0,020	----	0,052	0,024
Coefficient de variation de reproductibilité, $CV(R)$, %	75,1	115,2	----	3,6	107,2
Limite de reproductibilité, R	0,11	0,06	----	0,15	0,07

Campestérol

ÉCHANTILLON	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nombre de laboratoires participants, n_P	19	19	19	19	19
Nombre de laboratoires retenus après élimination des outliers, n_D	18	18	17	18	18
Nombre de résultats des essais dans tous les laboratoires n_t	36	36	34	36	36
Mean (%)	3,22	3,13	2,98	10,74	6,99
Écart-type de répétabilité, s_r	0,044	0,045	0,029	0,100	0,061
Coefficient de variation de répétabilité, $CV(r)$, %	1,3	1,4	1,0	1,0	0,9
Limite de répétabilité, r	0,12	0,13	0,08	0,28	0,17
Écart-type de reproductibilité, s_R	0,085	0,087	0,086	0,259	0,167
Coefficient de variation de reproductibilité, $CV(R)$, %	2,6	2,8	2,9	2,4	2,4
Limite de reproductibilité, R	0,24	0,24	0,24	0,73	0,47

Stigmastérol

ÉCHANTILLON	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nombre de laboratoires participants, n_P	19	19	19	19	19
Nombre de laboratoires retenus après élimination des outliers, n_D	17	16	18	18	19
Nombre de résultats des essais dans tous les laboratoires n_t	34	32	36	36	38
Mean (%)	1,23	1,05	0,41	2,83	5,40
Écart-type de répétabilité, s_r	0,027	0,040	0,046	0,043	0,087
Coefficient de variation de répétabilité, $CV(r)$, %	2,2	3,8	11,1	1,5	1,6
Limite de répétabilité, r	0,08	0,11	0,13	0,12	0,24
Écart-type de reproductibilité, s_R	0,039	0,059	0,064	0,111	0,158
Coefficient de variation de reproductibilité, $CV(R)$, %	3,2	5,7	15,6	3,9	2,9
Limite de reproductibilité, R	0,11	0,17	0,18	0,31	0,44

Sitostérol apparent β

ÉCHANTILLON	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nombre de laboratoires participants, n_p	19	19	19	19	19
Nombre de laboratoires retenus après élimination des outliers, n_p	16	17	17	18	17
Nombre de résultats des essais dans tous les laboratoires n_t	32	34	34	36	34
Mean (%)	93,9	93,8	95,2	78,6	84,8
Écart-type de répétabilité, s_r	0,141	0,223	0,091	0,195	0,220
Coefficient de variation de répétabilité, $CV(r)$, %	0,15	0,24	0,10	0,25	0,26
Limite de répétabilité, r	0,4	0,6	0,3	0,6	0,6
Écart-type de reproductibilité, s_R	0,355	0,471	0,340	1,372	0,819
Coefficient de variation de reproductibilité, $CV(R)$, %	0,38	0,50	0,36	1,75	1,00
Limite de reproductibilité, R	1,0	1,3	1,0	4,0	2,2

$\Delta 7$ -Stigmastérol

ÉCHANTILLON	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nombre de laboratoires participants, n_p	19	19	19	19	19
Nombre de laboratoires retenus après élimination des outliers, n_p	18	19	19	17	18
Nombre de résultats des essais dans tous les laboratoires n_t	36	38	38	34	36
Mean (%)	0,70	0,94	0,27	3,52	1,10
Écart-type de répétabilité, s_r	0,028	0,056	0,025	0,090	0,040
Coefficient de variation de répétabilité, $CV(r)$, %	4,1	6,0	9,5	2,6	3,6
Limite de répétabilité, r	0,08	0,16	0,07	0,25	0,11
Écart-type de reproductibilité, s_R	0,086	0,084	0,067	0,171	0,087
Coefficient de variation de reproductibilité, $CV(R)$, %	12,3	8,9	25,3	4,9	7,9
Limite de reproductibilité, R	0,24	0,24	0,19	0,48	0,24

Dialcools triterpéniques (érythrodiol + uvaol)

ÉCHANTILLON	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nombre de laboratoires participants, n_p	19	19	19	19	19
Nombre de laboratoires retenus après élimination des outliers, n_p	17	15	19	18	15
Nombre de résultats des essais dans tous les laboratoires n_t	34	30	38	36	30
Mean (mg/kg)	22,38	27,17	1,80	1,06	2,9
Écart-type de répétabilité, s_r	0,214	0,333	0,215	0,162	0,108
Coefficient de variation de répétabilité, $CV(r)$, %	1,0	1,2	11,9	15,3	3,8
Limite de répétabilité, r	0,60	0,93	0,60	0,46	0,30
Écart-type de reproductibilité, s_R	1,028	1,257	0,450	0,342	0,210
Coefficient de variation de reproductibilité, $CV(R)$, %	4,6	4,6	25,0	32,2	7,3
Limite de reproductibilité, R	2,88	3,52	1,26	0,96	0,59

Teneur stérols totaux

ÉCHANTILLON	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
Nombre de laboratoires participants, n_p	18	18	18	18	18
Nombre de laboratoires retenus après élimination des outliers, n_p	17	18	18	17	17
Nombre de résultats des essais dans tous les laboratoires n_t	34	36	36	34	34
Mean (mg/kg)	4487,0	3169,8	1359,8	2066,5	1552,1
Écart-type de répétabilité, s_r	71,76	49,15	45,19	30,14	31,75
Coefficient de variation de répétabilité, $CV(r)$, %	1,6	1,6	3,3	1,5	2,1
Limite de répétabilité, r	200,9	137,6	126,5	84,4	88,9
Écart-type de reproductibilité, s_R	378,89	234,65	82,93	131,47	89,54
Coefficient de variation de reproductibilité, $CV(R)$, %	8,4	7,4	6,1	6,4	5,8
Limite de reproductibilité, R	1060,9	657,0	232,2	368,1	250,7

2. Références

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 : 1994 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 5: Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-6: 1994 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 6: Utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude