

Validation d'une méthode d'analyse permettant le dosage en parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation dans les denrées alimentaires = Validation of analytical procedure for the parallel quantification of the cholesterol and his oxides in food

Autor(en): **Rose-Sallin, Christine / Sieber, Robert / Bosset, Jacques Olivier**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **87 (1996)**

Heft 2

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982075>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Validation d'une méthode d'analyse permettant le dosage en parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation dans les denrées alimentaires*

Validation of Analytical Procedure for the Parallel Quantification of the Cholesterol and his Oxides in Food

Key words: Cholesterol oxidation product, Cholesterol, Analysis, Food, Gas chromatography-mass spectrometry

Christine Rose-Sallin, Robert Sieber, Jacques Olivier Bosset
Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne

Raffaele Tabacchi
Institut de chimie, Université de Neuchâtel, Neuchâtel

Introduction

Les produits d'oxydation du cholestérol (oxystérols) dans les denrées alimentaires sont d'un grand intérêt à cause de leurs implications potentielles dans le développement de l'athérosclérose et du cancer (1). Les oxystérols sont générés par oxydation enzymatique, autoxydation ou par exposition du cholestérol à la chaleur, à la lumière ou à une radiation (2, 3). Ils ont été détectés dans divers aliments d'origine animale tels que produits laitiers, poudres d'œuf, viandes et poissons. Il a été rapporté que certains procédés de fabrication et certaines conditions de stockage favorisent leur formation (4-6).

L'analyse des oxystérols dans les denrées alimentaires a fait l'objet d'une attention toute particulière durant ces dix dernières années. Même si plusieurs méthodes ont déjà été proposées, certains aspects analytiques soulèvent encore de vives controverses. *McCluskey* et *Devery* (7) passent d'ailleurs en revue les problèmes

* Conférence présentée le 8 septembre 1995 à Löwenberg/Morat lors de la 107^e assemblée annuelle de la Société suisse de chimie alimentaire et environnementale

liés au dosage des oxystérols dans les denrées alimentaires et expliquent la nécessité de valider un tel dosage selon des paramètres rigoureux.

Une étape particulièrement critique de l'analyse des oxystérols est celle de leur purification. Leur isolation est fréquemment gênée par la présence de grandes quantités de cholestérol, de triglycérides, de phospholipides ou d'autres lipides. La similitude structurale et chimique des divers oxystérols présents et la complexité de la fraction lipidique requièrent en outre une haute sélectivité. Une saponification préalable et/ou des techniques chromatographiques sont généralement nécessaires. Une analyse ou du moins une confirmation par spectrométrie de masse (MS) est également conseillée (8), car des monoglycérides ou des diglycérides ainsi que d'autres composés peuvent coéluer avec les oxystérols et gêner leur quantification ou entraîner une surestimation lorsqu'ils sont dosés par chromatographie gaz/liquide (GC) avec une détection par ionisation de flamme ou par chromatographie liquide/liquide (HPLC) avec une détection dans l'ultraviolet (9, 10).

Les diverses étapes de purification doivent être très douces, car la présence d'air, de lumière, de peroxydes dans les solvants, voire une élévation de la température peuvent être à l'origine de la formation d'oxystérols. En présence d'oxygène, l'activité de certains agents adsorbants tel que le gel de silice peut également être une cause de formation d'artefacts (11, 12). Le pH du milieu est aussi susceptible d'influencer la stabilité de certains oxystérols (13).

Un contrôle de la formation artefactuelle d'oxystérols durant les étapes de purification est toutefois possible en recourant à une analyse par MS avec du cholestérol marqué isotopiquement (14). Dans un précédent travail, une telle méthode a été développée et validée dans des laits en poudre (15). Après addition de cholestérol marqué par 7 atomes de deutérium en quantité équivalente au cholestérol endogène présent dans le lait en poudre, les oxystérols ont été purifiés par saponification douce, extraction de l'insaponifiable, extraction sur cartouche aminopropyle et quantifiés par GC-MS. La formation artefactuelle d'oxystérols peut ainsi être facilement déterminée – donc corrigée – par la quantité produite d'oxystérols marqués. Cette méthode offre en outre les avantages d'être sélective, spécifique et sensible (dosage par GC-MS en mode «selected ion monitoring») et permet de traiter plusieurs échantillons en parallèle, ce qui facilite son application en routine. Elle est donc plus intéressante que d'autres techniques très laborieuses recourant à des chromatographies sur colonnes ou à de l'HPLC préparative (16, 17).

Le présent travail a pour premier objectif d'étendre le champ d'application de cette méthode (15) à d'autres denrées alimentaires telles que différents fromages, beurre, saindoux et poudre d'œuf. La validation de cette méthode dans le cadre de ces nouveaux produits alimentaires a été effectuée sur la base:

- d'un contrôle de la pureté des pics en mesurant 2 masses correspondant à 2 fragments sélectifs pour chaque oxystérol;
- d'une mesure des taux de récupération dans ces différentes matrices;
- de la détermination des domaines de linéarité;
- de la mesure des limites de détection et de quantification;
- de la vérification de la répétabilité du dosage des oxystérols.

Le second objectif de ce travail est le dosage en parallèle du cholestérol en utilisant le même procédé de purification, ce qui permet de calculer le taux d'oxydation du cholestérol dans l'aliment considéré sans étape supplémentaire de préparation de l'échantillon. L'analyse du cholestérol est validée selon les critères de répétabilité, d'exactitude sur la base d'une poudre d'œuf certifiée comme matériel standard de référence et du taux de récupération dans les matrices étudiées. Cette double analyse a alors été appliquée aux divers aliments susmentionnés.

Partie expérimentale

Réactifs

Le 5-cholestène-3 β ,19-diol (19-hydroxycholestérol), le 5 β -cholestane-3 α -ol (épicoprostanol), le cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol et le 5 α ,6 α -époxycholestérol proviennent de Sigma (St. Louis, MO, USA), le cholestène-3-ol-7-one (7-cétocholestérol) d'Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA), le 5-cholestène-3 β , 25-diol (25-hydroxycholestérol), le 5-cholestène-3 β , 7 β -diol (7 β -hydroxycholestérol) et le 5-cholestène-3 β , 7 α -diol (7 α -hydroxycholestérol) de Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA). Le cholestérol est livré par Merck (Dietikon, Suisse) et le [25, 26, 26, 26, 27, 27, 27-²H₇]cholestérol par Numelec S.A. (Genève, Suisse). Les agents silylants N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA), triméthylchlorosilane (TMCS), N,O-bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA) proviennent de Fluka (Buchs, Suisse). Les solvants d'une pureté p.A. tels que l'éther éthylique (déperoxydé avec Molecular Sieve Deperox de Fluka), le méthanol, la pyridine ainsi que les solvants d'une pureté LiChrosolv tels que le n-hexane, l'acétone, l'acétate d'éthyle proviennent de chez Merck. Les cartouches SPE avec phase aminopropyle sont fournies par Supelco (Buchs, Suisse). L'eau utilisée est de qualité Milli-Q (Millipore Co.). La poudre d'œuf entier, comme matériel de référence certifié («Standard Reference Material» SRM 1845, NIST) pour l'analyse du cholestérol provient de Promochem (Wesel, Allemagne).

Echantillons

Les diverses denrées alimentaires (beurre fondu, fromage fondu, fromage à raclette et parmesan) proviennent du commerce. Le lait en poudre, le saindoux et la poudre de jaune d'œuf, de qualités fraîche et oxydée, ont été mis à la disposition des laboratoires qui ont participé à un essai collaboratif sur le dosage des oxystérols (organisateur: Prof. L.-A. Appelqvist, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden).

Homogénéisation des échantillons de type pâteux

Découper les échantillons de fromage (20 à 30 g) en petits morceaux, les surgeler dans de l'azote liquide, puis les moudre dans un moulin de ménage (par ex. Moulinex) jusqu'à l'obtention d'une fine poudre.

Chauffer le saindoux 15 min à 45 °C, puis l'homogénéiser en le brassant à l'aide d'une baguette de verre. Appliquer le même principe sans échauffement préalable pour le beurre fondu.

Procédé de purification et d'enrichissement

La figure 1 résume les étapes de purification utilisées.

Saponification à froid

Ajouter 1 µg de 19-hydroxycholestérol (standard interne pour l'analyse des oxystérols) et 1 mg d'épicoprostanol (standard interne pour l'analyse du cholestérol (18)) à 1 g de fromage réduit en poudre ou à 1 g de lait entier en poudre dans une éprouvette à col rodé. Fermer avec un bouchon en téflon. Pour les autres types d'échantillon analysés, adapter les prises d'épicoprostanol et d'échantillon aux teneurs en cholestérol et en graisse attendues ou estimées soit: 1 mg d'épicoprostanol pour 0,5 g de beurre fondu, 0,5 mg d'épicoprostanol pour 0,5 g de saindoux, 12 mg d'épicoprostanol pour 0,5 g de poudre d'œuf. Saponifier alors l'échantillon par l'addition de 10 ml d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium (à 1 mol/l) et agiter le mélange à l'aide d'un mélangeur rotatif (19) pendant 18 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Extraction de l'insaponifiable

Refroidir l'éprouvette contenant l'échantillon saponifié dans un bain de glace. Ajouter 10 ml d'eau et extraire la fraction insaponifiable 3 fois avec 10 ml d'éther éthylique déperoxydé. Réunir les extraits d'éther éthylique puis les laver une fois avec 15 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0,5 mol/l puis trois fois avec 15 ml d'une solution de sulfate de sodium à 0,47 mol/l. Sécher ensuite ces extraits avec du sulfate de sodium anhydre. Evaporer l'éther à l'aide d'un évaporateur rotatif (à température ambiante et sous 100 mbar).

Extraction sur cartouche SPE avec phase aminopropyle

Dissoudre l'extrait obtenu précédemment dans 0,5 ml du mélange hexane:acétate d'éthyle (95:5, v/v) puis le charger sur une cartouche SPE avec phase aminopropyle préalablement conditionnée avec 3 ml d'hexane. Dans le cas de la poudre d'œuf, l'extrait est dilué 5 fois, avant d'être appliqué sur la cartouche afin de prévenir une saturation par le cholestérol. Rincer le flacon avec 0,5 ml du même mélange. Dans une première fraction, éluer les composés non polaires résiduels, le cholestérol et l'épicoprostanol avec 6 ml du même mélange puis avec 10 ml d'hexane:acétate

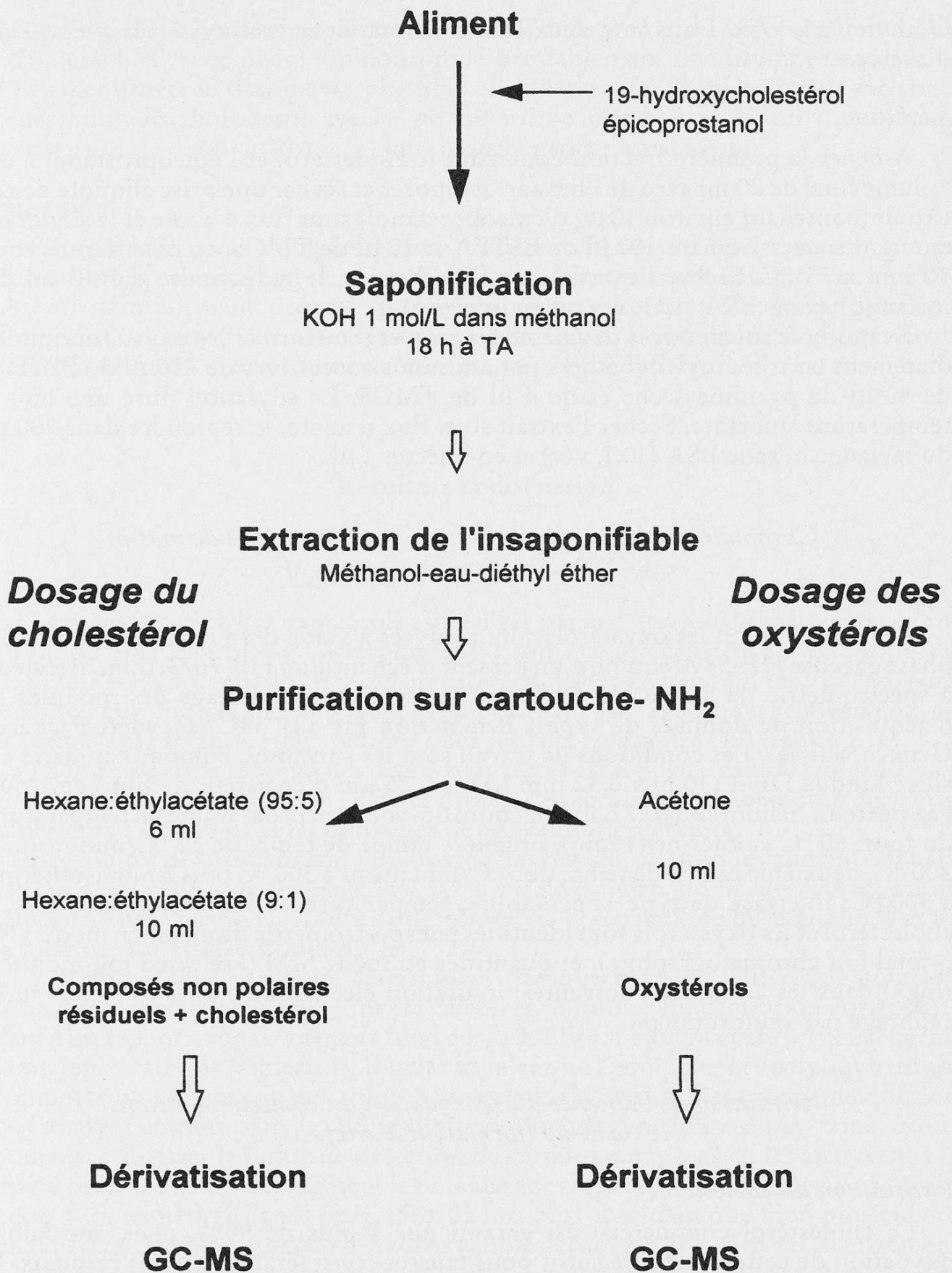


Fig. 1. Schéma du procédé de purification du cholestérol et de ses produits d'oxydation permettant leur dosage en parallèle par GC-MS

d'éthyle (9:1, v/v). Dans une deuxième fraction, éluer les oxystérols avec 10 ml d'acétone.

Silylation

Amener la première fraction contenant le cholestérol et l'épicoprostanol à un volume final de 20 ml avec de l'hexane. Evaporer et sécher une prise aliquote de cet extrait (contenant environ 10 µg d'épicoprostanol) sous flux d'azote et le silyler en ajoutant successivement 100 µl de BSTFA et 20 µl de TMCS, en chauffant le tout 30 min à 75 °C. Sécher l'extrait sous flux d'azote, le redissoudre dans 5 ml du mélange hexane:BSA (10:1, v/v) et en injecter 1 µl.

Evaporer le solvant de la deuxième fraction et transformer les oxystérols immédiatement en triméthylsilyl éthers par additions successives de 200 µl de BSTFA, de 40 µl de pyridine sèche et de 4 µl de TMCS. La silylation dure une nuit à température ambiante. Sécher l'extrait sous flux d'azote, le reprendre dans 200 µl du mélange hexane:BSA (10:1, v/v) et en injecter 1 µl.

Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse

Appareillage

Le cholestérol et les oxystérols sont analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse HP-5890 équipé d'un passeur d'échantillon HP-7673, d'un détecteur à spectrométrie de masse HP-5970 et d'un système de pilotage des modules et d'acquisition de données de type ChemStation HP-G1034C (Hewlett-Packard, Genève, Suisse). Les conditions de travail sont les suivantes: colonne capillaire en silice fondue DB-1 (30 m x 0,32 mm I.D. x 0,25 µm d'épaisseur de film) de J&W; gaz porteur: hélium sous 0,7 bar; injection: on-column; programme de température du four: 60 °C isotherme (1 min), première rampe de temp. de 30 °C/min jusqu'à 200 °C, deuxième rampe de temp. de 5 °C/min jusqu'à 300 °C puis 5 min isotherme à 300 °C; interface de type «open-split»; température de l'interface: 280 °C. Le cholestérol et les oxystérols sont identifiés par spectrométrie de masse en mode TIC («total ion chromatography»), et quantifiés en mode SIM («selected ion monitoring») dans les conditions suivantes: ionisation électronique à 70 eV et 0,8 mA, calibrage par «autotuning».

Vérification de l'absence d'autoxydation du cholestérol durant le clean-up (formation d'artefacts)

Purification du cholestérol

Le cholestérol commercial est garanti pur à plus de 99%, mais une faible oxydation de cette substance suffit pour fausser considérablement les résultats. Il faut par conséquent, le purifier en recourant à la même extraction sur cartouche SPE que celle déjà décrite. A cette fin, dissoudre environ 5 mg de cholestérol dans

0,5 ml du mélange hexane:acétate d'éthyle (95:5, v/v) puis les charger sur une cartouche SPE avec phase aminopropyle préalablement conditionnée avec 3 ml d'hexane. Rincer le flacon avec une nouvelle portion de 0,5 ml du même mélange. Eluer enfin le cholestérol avec 6 ml du même mélange et 10 ml du mélange hexane:acétate d'éthyle (9:1, v/v) puis le sécher sous flux d'azote.

Procédure

Répéter le procédé complet de purification et d'analyse des oxystérols sur un échantillon après addition de cholestérol purifié (en quantité équimolaire au cholestérol naturellement présent dans l'échantillon). Le contrôle de la formation d'oxystérols artefactuels est effectué par comparaison des quantités d'oxystérols déterminés dans l'échantillon avec et sans ajout de cholestérol.

Résultats et discussion

Analyse des oxystérols par GC-MS

La quantification des oxystérols est réalisée par la détection de chaque oxystérol en mode SIM à la masse correspondant à son ion moléculaire à l'exception du cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol et du 19-hydroxycholestérol (standard interne) qui sont analysés aux masses des fragments $[M-H_2O]^+$ et $[M-2 \times 90]^+$ respectivement, en accord avec la méthode déjà publiée pour les laits en poudre (15) (tableau 1).

La linéarité de la réponse des divers oxystérols est reportée dans le tableau 1. Les coefficients de détermination (R^2) des droites de régression calculées sont égaux ou supérieurs à 0,9960 dans les domaines de concentration étudiés.

Les limites de quantification du dosage des oxystérols dans les aliments ont été estimées à 0,1 $\mu\text{g/g}$ de fromage et à 0,2 $\mu\text{g/g}$ de poudre d'œuf, de beurre, ou de saindoux sur la base de la limite de détection, de la répétabilité de la méthode et de la formation d'artefacts (tableau 1).

Les limites de détection, déterminées par injection de 1 μl d'une solution contenant les standards purs, ont été calculées pour une concentration correspondant à un rapport signal / bruit de fond égal à 3. Elles se situent entre 0,1 et 0,3 ng/ml selon les oxystérols (tableau 1). Il faut rappeler que l'équipement analytique utilisé comporte un système «open-split» à l'interface GC-MS qui entraîne une dilution de l'analyte entrant dans le MS et diminue donc la sensibilité du système. Nous pourrions abaisser la limite de détection de certains composés en les analysant à la masse correspondant au fragment le plus abondant (par ex. à l'ion moléculaire après perte d'un triméthylsilanol (m/z 456), 25 fois plus abondant que l'ion moléculaire intact (m/z 546) du 7 α - et 7 β -hydroxycholestérol (15, 17)). Un tel abaissement n'apporterait toutefois pas beaucoup d'informations supplémentaires en raison des effets de matrices, plus importants pour des masses plus petites, qui diminuent sensiblement la répétabilité des mesures au voisinage des limites de détection. Ces

Tableau 1. Linéarité de la réponse des oxystérols, limites de détection et de quantification de la méthode

Oxystérol	Fragment considéré m/z	Limite de détection* (ng/ml)	Limite de quantification** (µg/g d'échantillon)	Domaine de linéarité (ng/ml)	Nbr. de mesures n	Coeff. déterm. R ²
7α-hydroxycholestérol	546	0,2	0,1; 0,2	0,2-19,1	21	0,9983
7β-hydroxycholestérol	546	0,2	0,1; 0,2	0,2-20,5	21	0,9983
5α, 6α-époxycholestérol	474	0,1	0,1; 0,2	0,1-11,8	21	0,996
cholestanetriol	546	0,1	0,1; 0,2	0,1-11,0	21	0,9962
25-hydroxycholestérol	546	0,3	0,1; 0,2	0,3-10,5	18	0,9975
7-cétocholestérol	472	0,1	0,1; 0,2	0,1-20,9	24	0,9987

* La limite de détection est définie pour une concentration correspondant à un rapport signal/bruit de fond égal à 3.

** La limite de quantification est estimée à 0,1 µg/g de fromage et à 0,2 µg/g de saindoux, de beurre ou de poudre d'œuf.

fragments ont été utilisés pour le contrôle de la pureté des pics lors du dosage des oxystérols. Le tableau 2 montre un rapport pratiquement constant des intensités des ions mesurés pour chaque oxystérol pour une solution standard, la poudre de jaune d'œuf, le saindoux et le fromage fondu.

Validation de la méthode de dosage des oxystérols dans divers aliments

Le 5α, 6α-époxycholestérol n'avait pas pu être quantifié avec précision lors de la première validation de la méthode dans des laits en poudre, car des impuretés coéluaiet et gênaient l'intégration du pic (15). L'analyse de ce composé a cependant pu être effectuée dans ce travail avec des matrices aussi complexes qu'une poudre de jaune d'œuf ou un lait en poudre (cf. ci-dessous).

Plusieurs ajouts d'une solution standard contenant les 6 oxystérols recherchés dans des échantillons pas ou faiblement oxydés de fromage fondu, de fromage à raclette, de parmesan, de saindoux et de poudre de jaune d'œuf ont permis de déterminer le taux de récupération et le domaine de linéarité de la méthode ainsi que de vérifier son applicabilité à différentes matrices. Les éventuelles teneurs naturelles de ces échantillons en oxystérols (avant ajouts) seront indiquées plus loin au §: «Application de l'analyse parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation à divers aliments». Les domaines de linéarité des ajouts, les coefficients de détermination des droites de régression correspondantes et les taux de récupération calculés pour chaque oxystérol sur la base de la pente desdites droites sont reportés dans les tableaux 3 et 4.

Pour les 3 fromages étudiés (tableau 3), les coefficients de détermination, situés entre 0,9875 et 0,9952 pour le cholestanetriol et entre 0,9983 et 0,9997 pour les autres oxystérols, montrent la linéarité et la répétabilité du taux d'extraction dans le domaine de concentration considéré. Les taux de récupération varient de 79 à 109%

Tableau 2. Contrôle de la pureté des pics des ions des oxystérols obtenus en mode «SIM» dans plusieurs échantillons

Oxystérol	rapport des ions	Rapport d'intensité des ions mesurés dans plusieurs échantillons			
		solution standard nbr. de mesures = 5	poudre jaune d'œuf nbr. de mesures = 8	saindoux nbr. de mesures = 8	fromage fondu nbr. de mesures = 5
7 α -hydroxycholestérol	546*/456	0,0196 \pm 0,0007	**	0,0185 \pm 0,0003	0,0200 \pm 0,0002
7 β -hydroxycholestérol	546*/457	0,0194 \pm 0,0005	0,0213 \pm 0,0014	0,0206 \pm 0,0010	0,0210 \pm 0,0004
5 α , 6 α -époxycholestérol	474*/384	0,9801 \pm 0,0333	1,0156 \pm 0,0500	0,9723 \pm 0,0266	0,9957 \pm 0,0091
cholestanetriol	546*/456	0,5508 \pm 0,0354	0,4581 \pm 0,0759	0,5879 \pm 0,1461	0,5365 \pm 0,0091
25-hydroxycholestérol	546*/456	0,4285 \pm 0,0268	0,3665 \pm 0,0431	0,4178 \pm 0,0279	0,4340 \pm 0,0078
7-cétocholestérol	472*/367	2,1026 \pm 0,0140	2,1604 \pm 0,0607	2,1091 \pm 0,0329	1,9794 \pm 0,0166

* Ion utilisé lors du dosage.

** Le rapport n'a pas pu être calculé, car le pic à la masse 456 présentait un épaulement.

Tableau 3. Domaines de linéarité, coefficients de détermination et taux de récupération des oxystérols calculés par régressions linéaires sur la base d'ajouts connus dans divers fromages

Oxystérol	Domaine de linéarité ($\mu\text{g/g}$)	Nbr. de mesures n	Fromage fondu		Parmesan		Fromage à raclette	
			Coeff. déterm. R^2	Taux de récupération (%)	Coeff. déterm. R^2	Taux de récupération (%)	Coeff. déterm. R^2	Taux de récupération (%)
7 α -hydroxycholestérol	0,0–5,3	6	0,9987	101	0,9983	102	0,9983	104
7 β -hydroxycholestérol	0,0–4,9	6	0,9993	104	0,9983	100	0,9993	103
5 α , 6 α -époxycholestérol	0,0–5,4	6	0,9997	97	0,9993	109	0,9993	103
cholestanetriol	0,0–2,2	6	0,9875	88	0,9946	83	0,9952	79
25-hydroxycholestérol	0,0–2,3	6	0,9996	103	0,9992	105	0,9997	104
7-cétocholestérol	0,0–7,3	6	0,9994	99	0,9991	95	0,9994	100

Tableau 4. Domaines de linéarité, coefficients de détermination et taux de récupération des oxystérols calculés par régressions linéaires sur la base d'ajouts connus dans du saindoux et de la poudre de jaune d'œuf

Oxystérol	Saindoux				Poudre de jaune d'œuf			
	Domaine de linéarité ($\mu\text{g/g}$)	Nbr. de mesures n	Coeff. déterm. R^2	Taux de récupération (%)	Domaine de linéarité ($\mu\text{g/g}$)	Nbr. de mesures n	Coeff. déterm. R^2	Taux de récupération (%)
7 α -hydroxycholestérol	0,0–10,3	8	0,9994	96	0,0–18,0	7	0,9941	68
7 β -hydroxycholestérol	0,0–10,6	8	0,9991	109	0,0–19,6	8	0,9983	85
5 α , 6 α -époxycholestérol	0,0–11,2	8	0,9994	113	0,0–20,1	8	0,9960	88
cholestanetriol	0,0– 7,8	8	0,9949	80	0,0– 9,3	6	0,9998	60
25-hydroxycholestérol	0,0– 6,1	8	0,9992	97	0,0– 7,3	6	0,9995	77
7-cétocholestérol	0,0–14,1	8	0,9992	106	0,0–16,9	6	0,9996	88

pour tous les oxystérols testés. Le cholestanetriol est cependant le moins bien extrait (79–88%), en raison vraisemblablement de sa plus forte polarité. Cette récupération moindre paraît occasionnée par l'étape de saponification, comme le suggère une étude comparative des procédés de purification des oxystérols (20).

Pour le saindoux et la poudre de jaune d'œuf (tableau 4), nous observons également une bonne linéarité et répétabilité du taux d'extraction dans le domaine de concentration étudié, avec des coefficients de détermination compris entre 0,9941 et 0,9998. Les taux de récupération dans le saindoux, compris entre 80 et

113%, sont du même ordre de grandeur que ceux mesurés dans les fromages. En revanche, des valeurs trouvées pour la poudre de jaune d'œuf sont sensiblement plus faibles (entre 60 et 88%), ce qu'il faut probablement attribuer à la plus grande complexité de cette matrice, en raison notamment de sa forte teneur en phospholipides, en protéines et en cholestérol (la poudre de jaune d'œuf contient 10 à 15 fois plus de cholestérol que les autres matrices étudiées).

Pie et al. (21) obtiennent des taux de récupération (situés entre 65% pour le cholestanetriol et 119% pour le 5 α ,6 α -époxycholestérol) comparables à ceux obtenus dans le présent travail lors de l'analyse d'un beurre avec le même standard interne. Certaines valeurs légèrement supérieures à 100%, notamment pour le 5 α ,6 α -époxycholestérol et le 7 β -hydroxycholestérol, peuvent s'expliquer par une correction un peu trop importante du 19-hydroxycholestérol. Dans cette étude, des essais préliminaires effectués avec d'autres standards internes tels que le 22-cétocholestérol et le 5 α -cholestane ont montré que ces composés étaient perdus durant l'étape de purification sur cartouche aminopropyle. Le 19-hydroxycholestérol semble donc le plus approprié. *Guardiola et al.* (20) arrivent à la même conclusion après avoir testé différents standards internes sur des cartouches en silice.

La répétabilité de la méthode est indiquée dans le tableau 5 pour le dosage des oxystérols dans un beurre fondu oxydé. Six analyses montrent des taux moyens d'oxystérols allant de 0,2 à 4,7 $\mu\text{g/g}$ de beurre fondu. Nous observons de faibles coefficients de variation compris entre 0,8 et 1,1% pour le 7 α - et le 7 β -hydroxycholestérol, le 7-cétocholestérol et le 5 α ,6 α -époxycholestérol. Nous avons mesuré des coefficients de variation un peu plus élevés, allant de 5,0 à 5,7% pour le cholestanetriol et le 25-hydroxycholestérol, oxystérols présents sous forme de traces proches de la limite de quantification. Nous avons constaté une meilleure répétabilité de cette méthode par rapport au travail précédent (15). L'absence d'artefacts, une meilleure maîtrise de la méthode de même qu'un changement de mode d'injection (analyse des oxystérols en mode «on-column» plus doux que le mode «splitless» à haute température (16)) peuvent expliquer cette amélioration.

Tableau 5. Répétabilité du dosage des oxystérols dans du beurre fondu ($n = 6$)

Oxystérol	Teneur moyenne ($\mu\text{g/g}$)	Ecart-type ($\mu\text{g/g}$)	Coefficient de variation (%)
7 α -hydroxycholestérol	2,41	0,02	0,83
7 β -hydroxycholestérol	3,67	0,03	0,82
5 α , 6 α -époxycholestérol	1,78	0,02	1,12
cholestanetriol	0,2	0,01	5,00
25-hydroxycholestérol	0,35	0,02	5,71
7-cétocholestérol	4,72	0,05	1,06

Les unités sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ d'échantillon avec une limite de quantification de 0,20 $\mu\text{g/g}$.

Formation d'artefacts durant l'analyse des oxystérols

Le procédé d'extraction et de purification complet a été testé avec du beurre fondu oxydé, après ajout de 2 mg de [²H₇]cholestérol par g d'échantillon. Ce cholestérol heptadeutééré a été purifié au préalable par une extraction sur cartouche. Six analyses n'ont montré la formation que de traces d'oxystérols deutérés. Le 7-cétocholestérol est le seul composé deutéré formé en traces effectivement quantifiables: $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ ($n = 6$). Cette concentration est cependant en dessous de la limite de quantification estimée à $0,2 \mu\text{g/g}$. Aucune correction n'a donc été appliquée au dosage des oxystérols, la formation d'artefacts durant le procédé de purification pouvant être considérée comme négligeable.

Du cholestérol non marqué, purifié selon la même méthode, a été utilisé pour contrôler la formation d'artefacts dans les autres échantillons. Le dosage en parallèle d'un échantillon avec et sans ajout de cholestérol a permis, de façon moins onéreuse, de vérifier une éventuelle oxydation du cholestérol durant les différentes étapes de purification et d'analyse. Cette stratégie n'a montré aucune formation artefactuelle d'oxystérols.

Lors de la validation de cette méthode dans les laits en poudre (15), des quantités plus importantes d'oxystérols marqués, notamment de 7-cétocholestérol et 25-hydroxycholestérol deutérés avaient été détectées et une correction pour en tenir compte avait dû être appliquée. Une meilleure maîtrise de la méthode, notamment plus de précautions (bain de glace, absence de lumière, rapidité d'exécution, etc.) pour éviter toute oxydation durant les différentes étapes de l'analyse ont certainement contribué à une diminution de l'autoxydation du cholestérol durant la préparation de l'échantillon. Ces résultats montrent toutefois la nécessité d'effectuer des contrôles réguliers, surtout en cas de modifications éventuelle des conditions de travail. Cette stratégie, par un ajout d'une quantité précise de cholestérol à l'échantillon, permet également de contrôler le taux de récupération lors du dosage du cholestérol (cf. ci-dessous).

Validation de la méthode de dosage du cholestérol par GC-MS

Il existe plusieurs méthodes de dosage du cholestérol plus simples que celle proposée dans le présent travail (22). La présence d'une grande quantité de cette substance dans les denrées alimentaires d'origine animale ne demande pas en effet plusieurs étapes d'enrichissement successives. Il suffit d'effectuer une saponification rapide à chaud de l'échantillon, suivie d'une extraction de l'insaponifiable et d'une injection en GC couplée avec une détection par ionisation de flamme après silylation (22). Puisqu'une élimination du cholestérol est indispensable pour l'analyse des oxystérols (ces derniers sont présents en concentration env. 1000 fois plus faibles que le cholestérol originel), sa récupération quantitative permet son analyse sans étapes supplémentaires autres que la silylation et son injection.

La quantification du cholestérol a été effectuée à l'aide d'épicoprostanol comme standard interne, en mode SIM, aux masses correspondant à l'ion moléculaire pour le premier (m/z 458) et au fragment [M-90]⁺ pour le deuxième (m/z 370).

L'exactitude du dosage du cholestérol a été vérifiée par l'analyse d'une poudre d'œuf certifiée comme matériel standard de référence (tableau 6). Ce dosage a donné une valeur moyenne de 18,9 ± 0,3 mg/g (n = 4), valeur égale à la valeur certifiée (19,0 ± 0,2 mg/g) si l'on considère l'incertitude analytique correspondante. Ces résultats confirment donc l'exactitude de la méthode. La précision, mesurée par le coefficient de variation (1,6%), est très proche de la valeur déclarée pour le produit certifié (1,1%). Le cholestérol, dont env. 10 à 15% sont présents dans l'œuf sous forme estérifiée, est donc totalement extrait par ce procédé. La saponification appliquée, très douce pour prévenir toute décomposition des oxystérols, semble donc efficace puisqu'elle permet également de libérer la fraction de cholestérol présent sous forme d'esters.

Tableau 6. Exactitude du dosage du cholestérol dans une poudre d'œuf certifiée

Teneur en cholestérol	Valeur moyenne (mg/g)	Ecart-type (mg/g)	Coefficient de variation (%)
déterminée*	18,9	0,3	1,6
valeur certifiée**	19,0	0,2	1,1

* Moyenne de 4 mesures.

** Matériel standard de référence SRM 1845.

Les taux de récupération du cholestérol ajouté ont également été vérifiés dans diverses matrices (tableau 7). Des valeurs entre 99 et 114% montrent que l'extraction est complète et que le standard interne choisi est adéquat.

Tableau 7. Taux de récupération du cholestérol ajouté à diverses denrées alimentaires

Denrée alimentaire	Ajout (mg/g)	Taux de récupération (%)	Nbr. de mesures n
saindoux	1	102	1
poudre jaune d'œuf	22	106	1
fromage à raclette	1	99	1
fromage fondu	1	104 ± 8	4
lait entier en poudre	1	103 ± 6	2
beurre fondu	3	114	1

Application de l'analyse parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation à divers aliments

Les résultats des analyses du cholestérol et des oxystérols effectués dans un saindoux et une poudre de jaune d'œuf frais et oxydés, dans un lait en poudre peu

oxydé, dans un fromage à raclette et un fromage fondu et dans un beurre fondu sont reportés dans le tableau 8. Aucuns oxystérols, à l'exception de faibles traces de 7-cétocholestérol ($< 0,10 \mu\text{g/g}$), ont été trouvés dans le fromage fondu. De faibles traces ($0,5$ et $0,1 \mu\text{g}$ d'oxystérols totaux par g d'échantillon) ont été détectées dans le lait entier en poudre et le fromage à raclette. Le beurre fondu chauffé et le saindoux (A) en contiennent un peu plus ($1,6$ et $1,3 \mu\text{g/g}$). La poudre de jaune d'œuf fraîche en contient $5,3 \mu\text{g/g}$; son stockage en revanche en produit une quantité plus élevée ($31,8 \mu\text{g/g}$). D'importantes quantités d'oxystérols ont été trouvées dans le saindoux oxydé (échantillon B), en dehors même du domaine de linéarité étudié (cf. tableau 4). Pour cet échantillon, il a donc été nécessaire de répéter l'analyse sur une partie aliquote plus petite ($0,05 \text{ g}$). Nous constatons néanmoins une bonne répétabilité pour l'analyse à double des oxystérols de cet échantillon (écarts-types correspondant à un coefficient de variation $< 6\%$) comme d'ailleurs pour les autres matrices.

Cette méthode permet d'analyser parallèlement le cholestérol et ses produits d'oxydation dans le même échantillon, donc d'évaluer le degré d'oxydation du cholestérol. A une exception près, le tableau 8 indique qu'une très faible portion du cholestérol (env. 1%) est oxydée. Seul le saindoux B contient d'importantes quantités d'oxystérols représentant env. 30% du cholestérol oxydé. L'oxystérol formé majoritairement dans les échantillons analysés est le 7-cétocholestérol, suivi des 7α - et 7β -hydroxycholestérol en raison de leur position allylique sur le carbone 7 qui facilite l'oxydation (3). Les autres produits d'oxydation se forment moins facilement.

Conclusion

La méthode proposée est parfaitement adaptée à l'analyse du cholestérol et de ses produits d'oxydation dans de nombreux produits alimentaires en recourant au même procédé de purification et sans extraction préalable des lipides. Il permet donc de calculer le taux d'oxydation (en %) du cholestérol originel. Cette méthode a été appliquée avec succès à des fromages de type parmesan, raclette et fondu, à du beurre, du saindoux, des laits en poudre et à des poudres de jaune d'œuf. Une saponification directe de l'échantillon à température ambiante et à l'obscurité, suivie d'une extraction de l'insaponifiable puis d'une purification sur cartouche aminopropyle permet de séparer le cholestérol et ses oxydes et d'enrichir suffisamment ces derniers pour un dosage par GC-MS. La méthode se caractérise par une bonne répétabilité (coefficients de variation inférieurs à 6%) et des taux de récupération des oxystérols compris entre 79 et 113% dans les fromages et le saindoux, entre 60 et 88% dans une poudre d'œuf. La détection en mode SIM permet, de par sa sélectivité et sa sensibilité, d'atteindre des limites de quantification pour les oxystérols de l'ordre de $0,1$ – $0,2 \mu\text{g/g}$ d'échantillon suivant la prise d'échantillon. Cette méthode est également suffisamment douce pour prévenir la production artefactuelle d'oxystérols durant les diverses étapes de purification.

Tableau 8. Application de la méthode d'analyse à diverses denrées alimentaires d'origine animale

Denrée alimentaire	Conditions de stockage/traitement de l'échantillon	Teneur en cholestérol (mg/g d'échantillon) et en oxystérols ($\mu\text{g/g}$ d'échantillon) dans divers aliments								Fraction cholestérol oxydé (%)
		cholestérol	7 α -hydroxy-cholestérol	7 β -hydroxy-cholestérol	5 α , 6 α -époxy-cholestérol	cholestane-triol	25-hydroxy-cholestérol	7-céto-cholestérol	oxystérols totaux	
saindoux A	après utilisation en friture	0,92	0,24 \pm 0,07	0,39 \pm 0,04	0,21 \pm 0,01	ND	ND	0,44 \pm 0,29	1,28	0,14
saindoux B		0,76	38,89 \pm 2,16	39,58 \pm 0,03	2,91 \pm 0,01	21,64 \pm 0,14	ND	127,81 \pm 0,95	230,83	30,37
p. de jaune d'œuf A	stocké 3 ans	24,30	2,53 \pm 0,28	0,92 \pm 0,03	< 0,20	< 0,20	0,27 \pm 0,04	1,57 \pm 0,08	5,29	0,02
p. de jaune d'œuf B		23,30	10,15 \pm 1,47	12,80 \pm 0,79	2,07 \pm 0,07	0,60 \pm 0,02	0,42 \pm 0,02	5,73 \pm 0,02	31,80	0,14
lait entier en poudre	stocké 3 mois à -25 °C	0,81	0,13 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	< 0,10	ND	ND	< 0,10	0,49	0,06
fromage à raclette	chauffé 30 min à 170 °C	0,85	< 0,10	< 0,10	ND	ND	ND	0,10 \pm 0,01	0,10	0,01
fromage fondu		n.d.	ND	ND	ND	ND	ND	< 0,10	< 0,10	-
beurre fondu		1,99	0,26 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01	ND	< 0,20	0,82 \pm 0,02	1,61	0,08

n.d. = non déterminé

p. = poudre

ND = non détecté

La détermination des oxystérols est faite en double ($n = 2$); seules les moyennes \pm écarts-types sont indiqués.

Remerciements

Le présent travail fait partie de la thèse de doctorat du premier auteur. Les auteurs tiennent à remercier *l'Institut Candia* (Centre de recherche international André Gaillard, Ivry-sur-Seine, France), la maison *Crema* (Villars-sur-Glâne près Fribourg, Suisse) ainsi que *la Fédération des coopératives Migros* (Zurich, Suisse) pour leur soutien financier accordé sous la forme d'une bourse offerte au premier auteur. Les auteurs remercient également les Dr Laurent Fay du Centre de Recherche Nestlé (Vers-chez-les-Blanc, Suisse) et Dr Raoul Daniel pour leur lecture critique du manuscrit.

Résumé

Ce travail reprend une méthode de dosage des produits d'oxydation du cholestérol (7 α - et 7 β -hydroxycholestérol, 7-cétocholestérol, 5 α ,6 α -époxycholestérol et 25-hydroxycholestérol) développée pour des laits en poudre et étend son application et sa validation à d'autres denrées alimentaires telles que poudre d'œuf, fromages, beurre et saindoux. Le procédé comporte une saponification douce à température ambiante, une extraction sur cartouche aminopropyle et une analyse par chromatographie en phase gazeuse avec une détection par spectrométrie de masse. L'intérêt particulier de cette méthode est de permettre l'analyse parallèle du cholestérol et de ses produits d'oxydation sans étape de purification supplémentaire. Une bonne répétabilité (coefficients de variation inférieures à 6%) et des taux de récupération des oxystérols entre 79 et 113% dans les fromages et le saindoux, entre 60 et 88% dans la poudre d'œuf caractérisent cette méthode. La limite de quantification est de 0,1–0,2 $\mu\text{g/g}$ d'échantillon pour le dosage des oxystérols. Le domaine de linéarité de la méthode a été vérifié pour chaque composé étudié. L'ajout de cholestérol marqué (hepta-deutéié) et non marqué montre que l'oxydation du cholestérol durant toutes les étapes de purification est négligeable, donc que la méthode est pratiquement exempt d'artefacts. Le dosage du cholestérol a été vérifié à l'aide d'une poudre d'œuf à teneur en cholestérol certifiée.

Zusammenfassung

Diese Arbeit nimmt eine Methode zur Bestimmung der Oxidationsprodukte des Cholesterins (7 α - und 7 β -Hydroxycholesterol, 7-Ketocholesterol, 5 α ,6 α -Epoxycholesterol und 25-Hydroxycholesterol) auf, die für Milchpulver entwickelt wurde. Deren Anwendung und Validierung wird auf andere Lebensmittel wie Eipulver, Käse, Butter und Schweineschmalz erweitert. Das Verfahren umfasst eine schonende Verseifung, eine Extraktion auf einer Aminopropyl-Säule und eine GC-MS-Analyse im «selected ion monitoring»-Modus. Dabei kann gleichzeitig in einer Probe auch das Cholesterin ohne zusätzliche Reinigungsstufen bestimmt werden. Eine gute Wiederholbarkeit (Variationskoeffizienten unterhalb von 6%) und Wiederfindungsraten von 79 bis 113% in Käsen und Schweineschmalz und von 60 bis 88% in Eipulver zeichnen diese Methode aus. Für die Oxidationsprodukte des Cholesterins liegt die Nachweisgrenze zwischen 0,1 und 0,2 $\mu\text{g/g}$ Probe. Die Linearität der Methode wurde für jede untersuchte Verbindung überprüft. Der Zusatz von mit Deuterium markiertem und nicht markiertem Cholesterin zeigte, dass eine Cholesterinoxidation während der Aufarbeitung vernachlässigbar ist und somit keine Artefakte entstanden sind. Mit einem Eipulver, das einen zertifizierten Cholesteringehalt aufwies, wurde die Cholesterinbestimmung überprüft.

Summary

A method for the quantification of cholesterol oxidation products (7 α - and 7 β -hydroxycholesterol, 7-ketocholesterol, 5 α ,6 α -epoxycholesterol and 25-hydroxycholesterol) in milk powder was applied and validated in other foods like egg powders, cheeses, butter and lard. The procedure allows soft saponification at room temperature, purification with an aminopropyl solid phase extraction cartridge and analysis by gas chromatography mass spectrometry. This procedure is noteworthy as the simultaneous analysis of cholesterol and its oxides from the same sample using a single clean-up. Good repeatability (coefficient of variation below to 6%) and recovery of cholesterol oxides between 79 and 113% in cheeses and lard, between 60 and 88% in egg powder are observed. The limit of quantification is 0.1–0.2 $\mu\text{g/g}$ of sample for the cholesterol oxides. The linearity of the method has been verified for each compound considered. Autoxidation of cholesterol during the clean up was controlled and found negligible with labelled and unlabelled cholesterol spiked to the sample. The quantification of cholesterol has been verified using a certified reference egg powder.

Bibliographie

1. Peng, S.-K. and Morin, R.J. (eds.): Biological effects of cholesterol oxides, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1992.
2. Smith, L.L.: Cholesterol autoxidation. Plenum Press, New York 1981.
3. Rose-Sallin, C., Sieber, R., Bosset, J.O. et Tabacchi, R.: Mécanismes d'oxydation du cholestérol: un article de synthèse. OCL – Oléagineux, Corps gras, Lipides. Soumis pour publication.
4. Finocchiaro, E.T. and Richardson, T.: Sterol oxides in foodstuffs: a review. J. Food Protect. **46**, 917–925 (1983).
5. Addis, P.B. and Park, S.W.: Cholesterol oxides content in foods. In: Peng, S.-K. and Morin, R.J.: Biological effects of cholesterol oxides, 71–88. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London 1992.
6. Osada, K., Kodama, T., Cui, L., Yamada, K. and Sugano, M.: Levels and formation of oxidized cholesterols in processed marine foods. J. Agric. Food Chem. **41**, 1893–1898 (1993).
7. McCluskey, S. and Devery, R.: Validation of chromatographic analysis of cholesterol oxides in dried foods. Trends Food Sci. Technol. **4**, 175–178 (1993).
8. Pizzoferrato, L., Nicoli, S. and Lintas, C.: GC-MS characterization and quantification of sterols and cholesterol oxidation products. Chromatographia **35**, 269–274 (1993).
9. Sallin, C., Baumann, E., Bütikofer, U., Sieber, R. et Bosset, J.O.: Contribution au dosage des oxystérols dans le lait et les produits laitiers. I. Possibilités et limites des techniques RP-HPLC. Trav. chim. aliment. hyg. **84**, 141–157 (1993).
10. Caboni, M.F., Toschi, T.G., Lerker, G. and Capella, P.: Analytical problems of oxisterols determination in lipid-containing foods. Riv. It. Sost. Grasse **71**, 243–246 (1994).
11. Claude, J.R. and Beaumont, J.L.: In vitro transformations of cholesterol: their importance during chromatographic analyses. J. Chromatogr. **21**, 189–201 (1966).
12. Horvath, C.: Quantitative determination of cholesterol in autooxidation mixtures by thin-layer chromatography. J. Chromatogr. **22**, 52–59 (1966).
13. Kim, S.K. and Nawar, W.W.: Parameters influencing cholesterol oxidation. Lipids **28**, 917–922 (1993).

14. *Wasilchuk, B.A., Le Quesne, P.W. and Vouros, P.W.:* Monitoring cholesterol autoxidation processes using multideuteriated cholesterol. *Anal. Chem.* **64**, 1077–1087 (1992).
15. *Rose-Sallin, C., Huggett, A.C., Bosset, J.O., Tabacchi, R. and Fay, L.B.:* Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [²H₇]cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 935–941 (1995).
16. *Van de Bovenkamp, P., Kosmeijer-Schuil, T.G. and Katan, M.B.:* Quantification of oxysterols in Dutch foods: egg products and mixed diets. *Lipids* **23**, 1079–1085 (1988).
17. *Nielsen, J.H., Olsen, C.E., Duedahl, C. and Skibsted, H.:* Isolation of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. *J. Dairy Res.* **62**, 101–113 (1995).
18. *Dieffenbacher, A., Golay, P.A. und Fay, L.B.:* Einige Bemerkungen zur Anwendung der offiziellen Methoden des § 35 des Deutschen Lebensmittelgesetzes zur Bestimmung des Cholesteringehaltes in Eiersatzprodukten. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **90**, 74–77 (1994).
19. *Imhof, M., Knecht, P. und Bosset, J.O.:* Die Bestimmung der freien Fettsäuren in Milch und Rahm. IV. Standardisierung der Extraktion von freien Fettsäuren und Untersuchung der Probenstabilität. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **86**, 157–168 (1995).
20. *Guardiola, F., Codony, R., Rafecas, M. and Boatella, J.:* Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *J. Chromatogr. A* **705**, 289–304 (1995).
21. *Pie, J.E., Spahis, K. and Seilan, C.:* Evaluation of oxidative degradation of cholesterol in food and food ingredients: identification and quantification of cholesterol oxides. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 973–979 (1990).
22. *Fenton, M.:* Chromatographic separation of cholesterol in foods. *J. Chromatogr.* **624**, 369–388 (1992).

Prof. Raffaele Tabacchi
Institut de chimie
Université de Neuchâtel
CH-2000 Neuchâtel

Christine Rose-Sallin
Dr Robert Sieber
Dr Jacques Olivier Bosset
Station fédérale de
recherches laitières
CH-3097 Liebefeld-Berne