

Comparaison de la Chromatographie Liquide à Haute Performance et de la Chromatographie en Phase Gazeuse pour l'analyse des oxystérols

A. Grandgirard et C. Cordelet

INRA, Unité de Nutrition Lipidique, Dijon, France

Most analytical methods for oxysterols identification and quantification use GC. These methods are very useful, in particular when GC is coupled with MS. Some difficulties however remain concerning derivatization and possible artefact formation. HPLC-MS appears as the method of future. HPLC with light scattering detector could also be very useful in detecting sterol hydroperoxides and preventing artefact formation.

Les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol (oxycholestérols) ou de stérols végétaux (oxyphytostérols). Il ne sera ici question que des oxycholestérols, qui sont les composés les plus étudiés ; tout ce qui concerne les oxycholestérols peut aisément être transposé aux oxyphytostérols.

En plus de la fonction alcool en 3, les oxystérols peuvent contenir des fonctions céto, époxy, alcool, hydroperoxy [1] ; les principaux oxystérols (Fig. 1) sont issus :

- d'une oxydation en position 7 du stérol (7-hydroxycholestérol ; 7-hydroxycholestérol ; 7-oxocholestérol)
- d'une oxydation de la double liaison (cholestérol-5,6-époxyde ; cholestérol-5,6-époxyde ; cholestanetriol)
- d'une oxydation sur la chaîne latérale (25-hydroxycholestérol ; 20-hydroxycholestérol).

Ces oxystérols peuvent être formés au cours des traitements technologiques des aliments ou du stockage, à partir des stérols initialement présents [2]. Ces composés, après absorption intestinale, interfèrent avec les oxystérols formés *in vivo* [3]. L'ensemble de ces composés, qu'ils soient d'origine alimentaire ou qu'ils aient été formés dans l'organisme, peut avoir de nombreuses propriétés biologiques [4] : effet inhibiteur sur la biosynthèse du cholestérol, effet cytotoxique, rôle dans l'athérosclérose, etc... Cela explique que des travaux de plus en plus nombreux soient consacrés à ces composés.

Cependant, le dosage de ces composés présente encore quelques difficultés.

- D'abord, les oxystérols ne représentent que quelques ppm des lipides, et il faut arriver à les séparer des autres composés, sans les altérer.
- Ensuite, des oxystérols parasites peuvent se former effectivement au cours de l'analyse, à partir des stérols non-altérés (qui sont présents en quantité beaucoup plus

importante que les oxystérols), si l'on ne prend pas assez de précautions pour protéger les échantillons [5].

- Enfin, certains oxystérols peuvent être détruits lors de certaines étapes de l'analyse, si elles sont effectuées dans des conditions trop drastiques [6].

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour le dosage des oxystérols. La plupart comportent une phase de concentration-purification et une phase de détection-quantification. Il ne sera ici question que de la phase de détection-quantification. La majorité des analyses s'effectue par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ; mais on note un regain d'intérêt pour les méthodes utilisant la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Méthodes utilisant la CPG

L'amélioration des connaissances sur les oxystérols a été de pair avec les progrès de la CPG. En 1967, Fioriti et Sims ont fait un pas décisif en proposant la dérivatisation des oxystérols en triméthylsilyl ethers (TMS), afin d'éviter la décomposition de certains d'entre eux sur la colonne [7] ; cela leur a permis par exemple de déceler pour la première fois les époxydes du cholestérol. A la même époque, Chicoye et al. [8] ont trouvé que les épimères 7-hydroxycholestérol étaient décomposés sur phases polaires, mais ne l'étaient pas sur phases apolaires telles que SE-30. Cette propriété s'est révélée très utile lors de l'introduction par l'équipe de Crastes de Paultet des colonnes capillaires pour ce type de dosage [9]. Quelques années plus tard, Park et Addis [10] ont encore amélioré le dosage en proposant l'utilisation des phases 100 % diméthylpolysiloxane (comme DB1 ou HP1), ou 5 % phenyl-95 % diméthyl polysiloxane (comme DB5 ou HP5) : ces phases sont à présent les plus utilisées pour la détermination des oxystérols par CPG.

La détection est toujours réalisée par ionisation de flamme ou par SM. L'injecteur « on column » est souvent recommandé [11-14], du fait qu'il provoque moins de dégradation thermique, de vaporisation sélective et parce qu'il améliore la sensibilité par rapport à l'injecteur « split-splitless ».

Bien que l'on trouve encore des études où les oxystérols sont dosés sans dérivatisation [15], la plupart des déterminations d'oxystérols sont effectuées après dérivatisation, pour améliorer la stabilité thermique des composés et éviter la traînée des pics. Les principaux dérivés utilisés sont les éthers triméthylsilylés (TMS), qui sont assez faciles à réaliser et qui présentent une fragmentation intéressante en

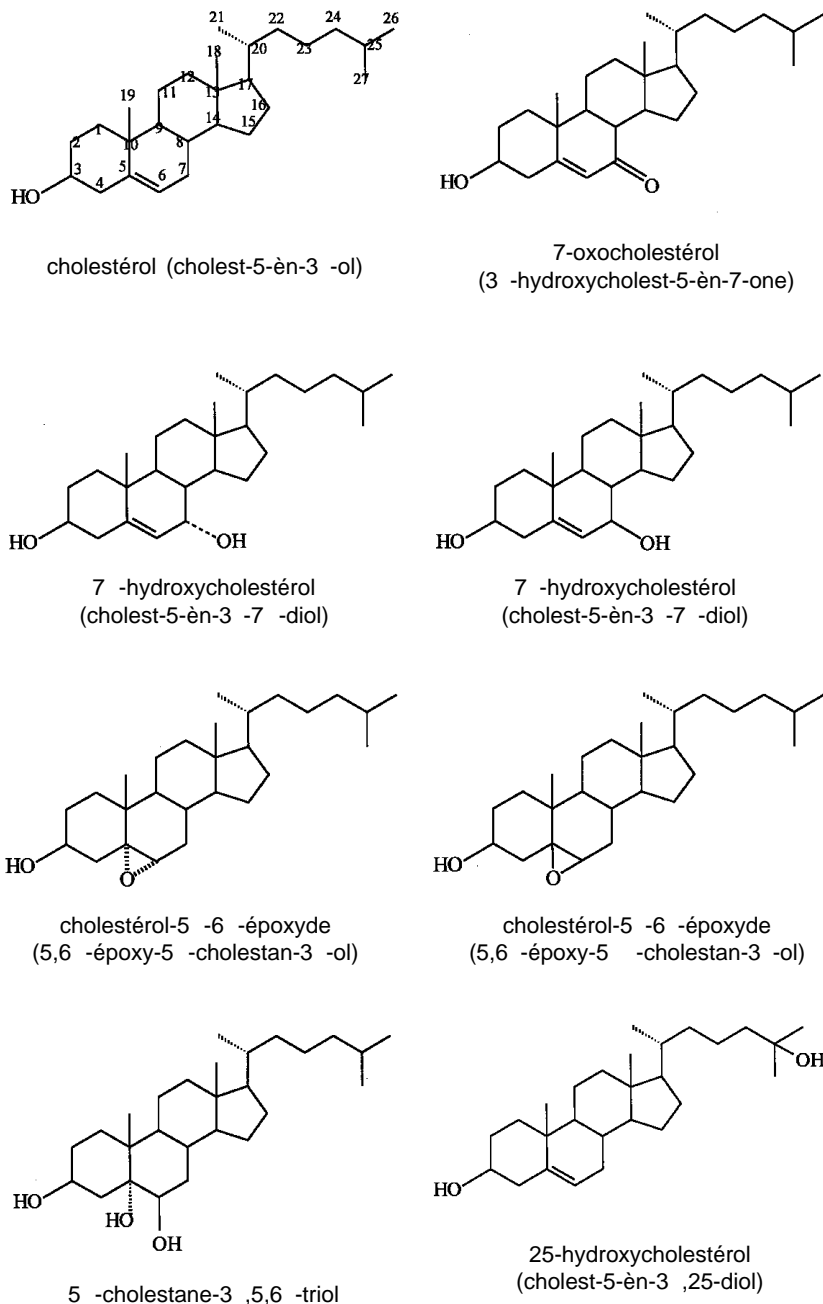


Figure 1. Formules du cholestérol et de quelques oxysterols.

spectrométrie de masse (SM) [16]. Cependant, les méthodes de silylation sont extrêmement variées. Le tableau I donne une idée (non-exhaustive) de la diversité des réactifs utilisés : BSA (N,O-bis-triméthylsilyl-acétamide), HMDS (1,1,1,3,3,3-hexaméthyl-disilazane), TMCS (triméthylchlorosilane), BSTFA (bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide), TMSI (triméthylsilyl-imidazole), seuls ou en mélanges variés ; les températures utilisées vont de la température de la pièce à 120 °C ; les durées de réaction vont de 15 minutes à 24 heures ; le solvant le plus couramment utilisé est la pyridine, mais du DMF (diméthylformamide) est également utilisé. La diversité de ces conditions opératoires traduit une

difficulté majeure : arriver à dériver en une seule étape des composés assez différents. L'idéal serait probablement de dériver séparément chaque groupe de composés, comme cela a été réalisé par exemple par Brooks et al. [17]. Dans ce cas, les groupes hydroxyles difficilement accessibles sont dérivés avec des réactifs plus puissants, comprenant en particulier du TMSI. Mais il faut alors séparer ces composés au préalable et cette étape supplémentaire peut être génératrice d'artefacts, si elle est réalisée dans des conditions où il y a une possibilité d'oxydation, comme par exemple par chromatographie sur couche mince (CCM).

Tableau I. Quelques exemples des conditions utilisées pour la réalisation de dérivés TMS d'oxystérols.

Réactifs	Température	Durée	Référence
pyridine/HMDS/TMCS 1/1/1	20 °C	2 h	[18]
pyridine/HMDS/TMCS 1/1/1	60 °C	30 min	[13]
pyridine/HMDS/TMCS 15/10/1	20 °C	1 h	[19]
pyridine/HMDS/TMCS 3/2/1	60 °C	30 min	[20]
pyridine/BSA 1/1	60 °C	15 min	[21]
pyridine/SYLON BTZ 1/1	20 °C	15 min	[10]
pyridine/SYLON BTZ 1/1	60 °C	1 h	[22]
pyridine/BSTFA (avec 1 % TMCS) 1/1	20 °C	50 min	[23]
pyridine/BSTFA (avec 1 % TMCS) 1/1	80 °C	1 h	[24]
pyridine/BSTFA/TMCS 20/100/2	20 °C	16 h	[25]
DMF/HMDS/TMCS 1/1/1	20 °C	1 h	[26]
DMF/BSTFA 1/1	80 °C	1 h	[27]
HMDS/TMCS 1/1	60 °C	1 h	[28]

Le Sylon BTZ est le mélange TMSI/BSA/TMCS 3/3/2.

Tous ces procédés de silylation ne sont pas parfaits, ni équivalents : on note par exemple sur certains chromatogrammes la persistance de stérols qui n'ont pas réagi [29] ; il est également souvent signalé que certains composés polyols, tels que le 5 -cholestane-3 ,5,6 -triol ou le 25-hydroxy-cholestérol apparaissent en plusieurs pics, suivant le nombre de fonctions hydroxyles qui sont silylées [30]. Par ailleurs, Nawar et al. [24] ont testé plusieurs méthodes de silylation et ont montré qu'elles pouvaient donner des résultats assez différents; en particulier le Sylon BTZ donnait de mauvais rendements de silylation. Nous avons récemment observé le même phénomène [31], et avons de plus noté que ce réactif pouvait dégrader rapidement la colonne CPG, si le mélange de réaction était injecté sans extraction préalable, comme cela se fait souvent. Au cours de la même étude, nous avons également constaté que le 20 -hydroxycholestérol donnait en général 2 pics principaux, de temps de rétention assez proches et que, suivant la méthode de silylation utilisée, c'était l'un ou l'autre pic qui était le pic principal (Fig. 2). La spectrométrie de masse nous a révélé que l'un de ces composés (Fig. 3) présentait une fragmentation analogue à celle qui a été décrite par Brooks et al. [17] pour le 20 -hydroxycholestérol sous forme TMS ($m/e = 201$ et 461), tandis que l'autre pic (Fig. 4) donnait une fragmentation proche de celle trouvée par Pizzoferrato et al. [28] ($m/e = 456$ (M-90), 366 (M-180), 389, 299, 256, etc...). La raison de cette dichotomie est encore à l'étude. Ces quelques exemples nous montrent cependant que la dérivation des oxystérols en dérivés TMS pose encore quelques problèmes. Par ailleurs, la conservation des dérivés TMS est délicate, car ces composés sont très sensibles à l'hydrolyse.

D'autres dérivés ont également été proposés pour les oxystérols. Par exemple, Korahani et al ont proposé de bloquer les fonctions oxo sous forme d'oximes, avant de réaliser la triméthylsilylation [9]. On note également un intérêt grandissant pour les dérivés tertio-butyldiméthylsilylés (TBDMS) [32-33]. En effet, ces composés sont un peu plus stables que les dérivés TMS et la sensibilité de leur détection est améliorée en spectrométrie de masse, du fait de leur plus faible degré de fragmentation. Enfin, on peut également

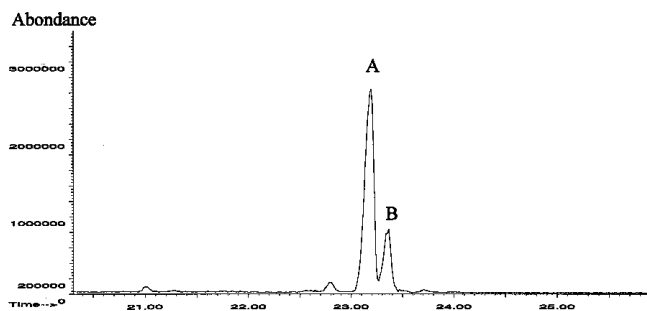


Figure 2. Chromatographie des ions totaux, lors de la CPG-SM de 20 -hydroxycholestérol sous la forme TMS.

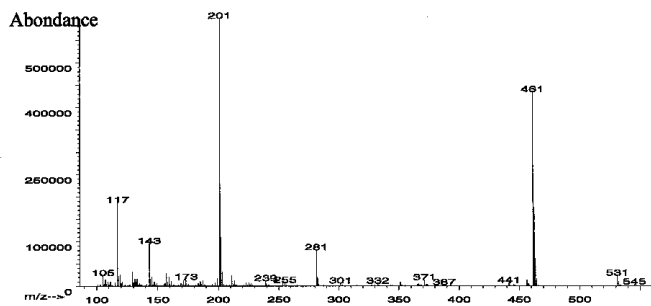


Figure 3. Spectre de masse en impact électronique du composé A de la figure 2.

signaler l'utilisation de dérivés acétates dans quelques cas [34].

La quantification est très souvent réalisée grâce à l'ajout d'un standard interne. Le 5 -cholestane est souvent utilisé, mais il présente l'inconvénient d'être éliminé lors de la plupart des étapes de purification et doit donc de ce fait être ajouté seulement à la fin de l'analyse. En ce qui concerne

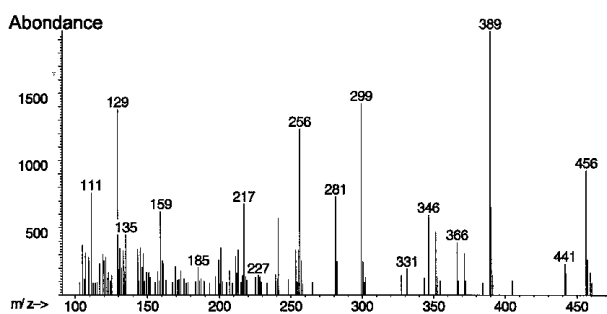


Figure 4. Spectre de masse en impact électronique du composé B de la figure 2.

le 6-oxocholestanol, il a été établi récemment [35] que ce composé pouvait donner deux isomères énols lors de la réaction de triméthylsilylation et que de ce fait, il ne peut être utilisé qu'avec beaucoup de précautions. La bétuline est très bien placée en CPG [36], mais sa solubilité dans les solvants habituels des oxystérols est limitée. Bien d'autres composés ont été proposés comme standard internes : 7-oxopregnolone, 5 α -androstan-3 α -ol-17-one acetate, 7-oxositostérol, 11 β -hydroxyprogesterone, 11 β ,17 β -dihydroxyprogesterone, 19-hydroxycholestanol... Dans un travail récent, Guardiola et al. ont montré que le 19-hydroxycholestanol était le standard interne le plus fiable et le plus adapté, parmi ceux qu'ils avaient testés [37]. La quantification est habituellement faite en utilisant les coefficients de réponse relatifs par rapport au standard interne.

L'un des principaux avantages de la CPG est sa facilité de couplage avec la spectrométrie de masse (SM). La fragmentation des oxystérols en SM, en particulier sous forme de dérivés TMS, a très tôt montré son utilité [16]. Depuis cette date, toutes les confirmations de structure ont utilisé cette méthode, si l'on excepte l'identification par résonance magnétique nucléaire (RMN) effectuée par Fontana et al. [38]. Le lecteur pourra se reporter à la revue récente de Addis et al. [39], qui a détaillé la spectrométrie de masse des oxystérols. L'un des développements les plus intéressants de la CPG-SM est l'introduction du mode SIM (single ion monitoring) pour la détection et la quantification des oxystérols [22,40] : ceci permet une meilleure sélectivité et donc une sensibilité plus élevée. L'autre évolution fondamentale, rendue possible par l'amélioration des techniques de SM, est l'utilisation d'isotopes stables (en général deutérés) [20,25,30,41] pour contrôler la formation éventuelle d'artefacts au cours de l'analyse et améliorer la précision des dosages.

Après ce rapide tour d'horizon, il apparaît que la CPG peut être extrêmement utile pour le dosage des oxystérols. On atteint à présent une limite de détection de 500 picogrammes [11]. Mais quelques questions ne sont apparemment pas encore totalement résolues, en particulier celles qui concernent le choix des dérivés, ainsi que le risque d'altération de certains oxystérols au cours de l'analyse. On peut d'ailleurs noter que les hydroperoxydes de cholestérol n'ont jamais pu être détectés par CPG, alors que ces composés sont considérés comme les premiers susceptibles de se former au cours de l'autoxydation ou de la peroxydation du cholestérol [42]. Leur identification n'a jusqu'ici été possible

qu'après transformation en hydroxycholestérols (par exemple par réduction au borohydrure), qui ont ensuite pu être analysés classiquement [43-44].

Méthodes utilisant la CLHP

Dans sa revue parue il y a quelques années [45], Smith avait noté que l'application de la CLHP au dosage des oxystérols avait commencé assez tardivement et qu'assez peu d'études avaient utilisé cette méthode, malgré son potentiel important et bien que beaucoup de purifications aient été effectuées par CLHP. Nous allons ici essayer de cerner les raisons de cet état de fait, ainsi que les évolutions actuelles.

Il semble bien que deux problèmes principaux aient freiné le développement de cette méthode : la détection et la sensibilité. En effet, certains oxystérols et non des moindres (5 α ,6 α -époxycholestérol ; 5 α ,6 β -époxycholestérol ; cholestane-3 α ,5 α ,6 α -triol ne sont pas détectables en ultraviolet (UV). De plus, le maximum d'absorption du 7 β -hydroxycholestérol et du 25-hydroxycholestérol est à 202 nm, alors que celui du 7 α -oxocholestérol est à 233 nm. Le réfractomètre permet de déceler tous les oxystérols, mais sa gamme de sensibilité n'est pas adaptée au dosage de traces : d'après Chen et Chen [46], le détecteur UV serait 1000 fois plus sensible que le réfractomètre ! Les deux détecteurs les plus employés en CLHP présentent ainsi des défauts majeurs.

Devant cette situation, plusieurs types de réponses ont été apportés.

- D'abord, certains auteurs n'ont déterminé qu'une partie des oxystérols (en particulier ceux qui étaient oxydés en C7), en estimant qu'ils étaient représentatifs de l'ensemble [47-49].
- Ensuite, certains ont réalisé des dérivés permettant l'analyse en UV : Sugino et al. ont transformé les époxydes en dérivés *p*-nitrobenzoylés [50] ; Fillion et al. ont réalisé des dérivés benzoylés ou dinitrobenzoylés [51] ; par action de la cholestérol oxydase, Teng et Smith ont transformé la plupart des oxystérols en 4-3-cétones [52]. Cependant, il a été signalé [39] que la stabilité de ces dérivés était critique et qu'une grande variabilité de résultats pouvait être obtenue.
- Enfin, certains ont placé en série un détecteur UV et un réfractomètre [53-55].

Les méthodes précédentes ont essentiellement été appliquées à des standards et n'ont que rarement servi à caractériser des aliments [50] [56], ou des échantillons biologiques [52]. Dans certains cas, les auteurs ont signalé que les résultats qu'ils obtenaient pouvaient être surévalués par la présence de composés inconnus qui étaient élués avec les oxystérols [56].

Alors que des séparations intéressantes avaient été élaborées, aussi bien en phase inverse qu'en phase normale (voir la revue de Smith [45] pour plus de détails), c'est donc la détection qui posait question pour l'analyse de ces composés.

Pourtant, récemment, plusieurs travaux ont montré l'intérêt de la CLHP pour l'analyse, avec le minimum d'altération, de composés aussi fragiles que les oxystérols :

- Maerker et al. ont appliqué avec succès aux oxystérols la CLHP avec détection par ionisation de flamme [57]. Il s'agit là d'un détecteur universel, limité simplement par les conditions d'évaporation du solvant. Les auteurs ont observé une linéarité satisfaisante de la réponse entre 0,39 µg et 100 µg par composé. Nous sommes évidemment loin de la sensibilité de la CPG, mais il est probable que l'on puisse optimiser cette technique.
- En utilisant la détection électrochimique, Korytowski et al. ont, les premiers, permis la séparation et la détection directe des hydroperoxydes de cholestérol [58-59]. Il s'agit là d'une avancée fondamentale, qui n'avait pas été possible par la CPG.
- Dans un travail qui fera date, Sevanian et al. ont comparé la CPG-SM et la CLHP-SM pour l'analyse des oxystérols dans des plasmas humains et de lapin [27]. La détection de masse résout en effet les problèmes de détection et de sensibilité de la CLHP. Par ailleurs, cela permet aussi d'obtenir l'identité des composés séparés avec quasi-certitude. La limite de détection trouvée dans ce travail, en particulier en utilisant l'interface « particle-beam », est de l'ordre du nanogramme, c'est-à-dire assez proche de celle

obtenue avec la CPG-SM. Ces auteurs signalent simplement qu'avec la CLHP-SM, ils sont parfois à la limite de la détection, alors que la CPG-SM est plus efficace dans ces conditions. Cependant, le fait de pouvoir déterminer des composés fragiles, y compris les hydroperoxydes de cholestérol, joue en faveur de la CLHP-SM.

- Enfin, deux études ont été publiées simultanément cette année sur l'utilisation du détecteur évaporatif à diffusion de la lumière pour l'analyse des oxystérols [60-61]. Ce détecteur est universel, sa seule limitation est que les composés analysés soient moins volatils que la phase mobile, ce qui ne pose pas de problème pour les oxystérols. La ligne de base n'est pas sensible au gradient de solvant. La linéarité de réponse n'est cependant établie que sur une gamme limitée de concentration. L'ensemble de ces caractéristiques laisse penser que ce détecteur pourrait être bien adapté au dosage des oxystérols. Les deux études parues récemment sont assez complémentaires : Lakritz et Jones [61] passent en revue différentes conditions expérimentales sur produits modèles, pour tester la linéarité et la répétabilité de la méthode ; Caboni et al. [60], ont comparé ce détecteur au détecteur UV et ont appliqué cette technique à l'analyse d'une poudre d'oeuf. Leur méthode permet en particulier de détecter les hydroperoxydes de cholestérol, en même temps que les oxystérols habituels (Fig. 5). Pour l'instant, les quantités les plus faibles détectées par ces auteurs sont d'environ 300 ng [60] et 100 ng [61]. Il est cependant probable que le développement et l'optimisation de cette méthode devraient permettre de faire descendre le seuil de détection.

Conclusion

La CPG reste la méthode de référence pour l'analyse des oxystérols, du fait de sa sensibilité et de sa meilleure résolution. Elle présente cependant encore quelques difficultés et est susceptible de provoquer plus d'artefacts qu'une méthode travaillant toujours à température modérée comme la CLHP. Cette dernière méthode s'est enrichie ces derniers temps de plusieurs possibilités intéressantes. La CLHP-SM apparaît de plus en plus comme la technique d'avenir pour le dosage précis des oxystérols en petites quantités, par exemple dans les échantillons biologiques. Cette technique n'est cependant pas à la portée de tous les laboratoires ! Dans le cas de l'analyse des oxystérols dans les aliments, où l'on n'est pas limité par la taille de l'échantillon, il est probable que la CLHP avec un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière pourra rendre beaucoup de services. A terme, il est possible que la CLHP soit de plus en plus utilisée pour ce type de dosage, dans le but de mieux préserver les échantillons de la génération d'artefacts.

Références

1. Smith, L. L. Cholesterol autoxidation. Plenum Press, New-York, 1981.
2. Bösinger, S.; Luf, W.; Brandl, E. *Int. Dairy J.* **1993**, 3, 1-33.
3. Crastes de Paulet, A.; Astruc, M. E., Bascoul, J. in: *Biologie des lipides chez l'homme*, Douste-Blazy, L.; Mendy, F. Eds.; Éditions Médicales Internationales, Paris, 1988; pp 154-174.

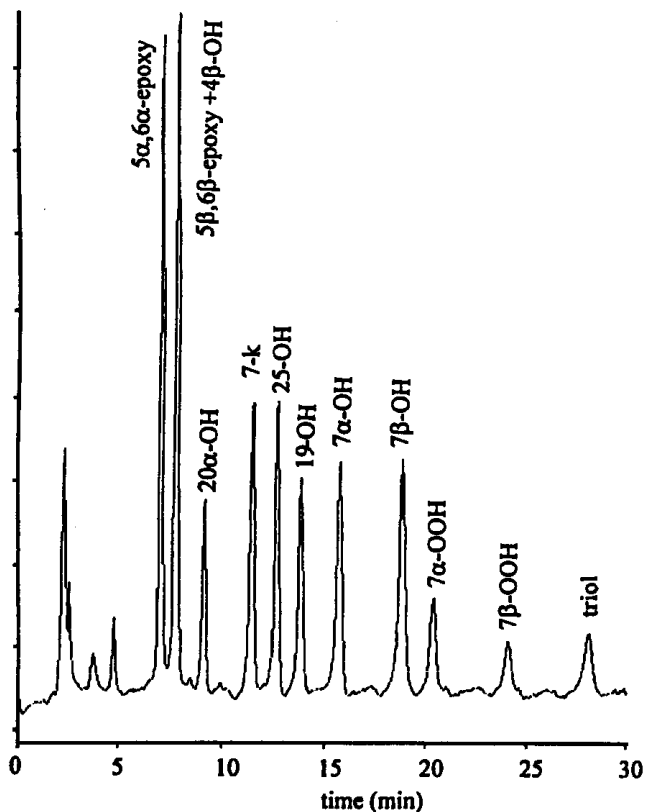


Figure 5. Chromatogramme d'oxystérols en CLHP avec un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière. (5 ,6 -époxy = cholestérol-5 ,6 -époxyde ; 4 -OH = 4 -hydroxycholestérol ; 5 ,6 -époxy = cholestérol-5 ,6 -époxyde ; 20 -OH = 20 -hydroxycholestérol ; 25-OH = 25-hydroxycholestérol ; 19-OH = 19-hydroxycholestérol ; 7 -OH = 7 -hydroxycholestérol ; 7 -OH = 7 -hydroxycholestérol ; 7 -OOH = 7 -hydroperoxycholestérol ; 7 -OOH = 7 -hydroperoxycholestérol ; triol = 5 -cholestane-3 ,5,6 -triol). d'après Caboni et al. [60].

4. Guardiola, F.; Codony, R.; Addis, P. B.; Rafecas, M.; Boatella, J. *Food Chem. Toxicol.* **1996**, *34*, 193-211.
5. Bjorkhem, I. *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 497-501.
6. Maerker, G.; Unruh, J. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1986**, *63*, 767-771.
7. Fioriti, J. A.; Sims, R. J. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1967**, *44*, 221-224.
8. Chicoye, E.; Powrie, W. D.; Fennema, O. *Lipids* **1968**, *3*, 551-556.
9. Korahani, V.; Bascoul, J.; Crastes de Paulet, A. *J. Chromatogr.* **1981**, *211*, 392-397.
10. Park, S. W.; Addis, P. B. *Anal. Biochem.* **1985**, *149*, 275-283.
11. Missler, S. R.; Wasilchuk, B. A.; Merritt, C. J. *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 595-598, 646.
12. Van de Bovenkamp, P.; Kosmeijer-Schuil, T. G.; Katan, M. B. *Lipids* **1988**, *23*, 1079-1085.
13. Nourooz-Zadeh, J. *J. Agr. Food Chem.* **1990**, *38*, 1667-1673.
14. Garcia Regueiro, J. A.; Maraschiello, C. *J. Chromatogr. A* **1997**, *764*, 279-293.
15. Hwang, K. T.; Maerker, G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70*, 371-375.
16. Brooks, C. J. W.; Horning, E. C.; Young, J. S. *Lipids* **1968**, *3*, 391-402.
17. Brooks, C. J. W.; Henderson, W.; Steel, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *296*, 431-445.
18. Pie, J. E.; Spahis, K.; Seillan, C. *J. Agr. Food Chem.* **1990**, *38*, 973-979.
19. Caboni, M. F.; Gallina Toschi, T.; Lercker, G.; Capella, P. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **1994**, *71*, 243-246.
20. Dzeletovic, S.; Breuer, O.; Lund, E.; Diczfalusy, U. *Anal. Biochem.* **1995**, *225*, 73-80.
21. Gaskell, S. J.; Smith, A. G.; Brooks, C. J. W. *Biomed. Mass Spectrom.* **1975**, *2*, 148-155.
22. Nielsen, J. H.; Olsen, C. E.; Duedahl, C.; Skibsted, L. H. *J. Dairy Res.* **1995**, *62*, 101-113.
23. Lai, S. M.; Gray, J. I.; Zabik, M. E. *J. Agr. Food Chem.* **1995**, *43*, 1122-1126.
24. Nawar, W. W.; Kim, S. K.; Li, Y. J.; Vajdi, M. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 496-498.
25. Rose-Sallin, C.; Huggett, A. C.; Bosset, J. O.; Tabacchi, R.; Fay, L. B. *J. Agr. Food Chem.* **1995**, *43*, 935-941.
26. Van Lier, J. E.; Smith, L. L. *Anal. Biochem.* **1968**, *24*, 419-430.
27. Sevanian, A.; Seraglia, R.; Traldi, P.; Rossato, P.; Ursini, F.; Hodis, H. *Free Rad. Biol. Med.* **1994**, *17*, 397-409.
28. Pizzoferrato, L.; Nicoli, S.; Lintas, C. *Chromatographia* **1993**, *35*, 269-274.
29. Carpenter, K. L. H.; Taylor, S. E.; Ballantine, J. A.; Fussell, B.; Halliwell, B.; Mitchinson, M. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1167*, 121-130.
30. Wasilchuk, B. A.; Le Quesne, P. W.; Vouros, P. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1077-1087.
31. Grandgirard, A.; Demaison-Meloche, J.; Giniès, C. Use of various trimethylsilylation techniques in determination of oxysterols by GLC and GLC-MS; *1st Meeting of the AOCs European Section*. Dijon (France), 19-20 septembre 1996.
32. Breuer, O.; Bjorkhem, I. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20278-20284.
33. Song, W.; Pierce, W. M.; Saeki, Y.; Redinger, R. N.; Prough, R. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *328*, 272-282.
34. Koch, P.; Luu, B.; Beck, J. P.; Ourisson, G. *Bull. Soc. Chim. France II* **1985**, 779-782.
35. Park, P. W.; Guardiola, F.; Park, S. H.; Addis, P. B. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 623-629.
36. Johnson, C. B. *J. Chromatogr. A* **1996**, *736*, 205-210.
37. Guardiola, F.; Codony, R.; Rafecas, M.; Boatella, J. *J. Chromatogr. A* **1995**, *705*, 289-304.
38. Fontana, A.; Antoniazzi, F.; Ciavatta, M. L.; Trivellone, E.; Cimino, G. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 1286-1290.
39. Addis, P. B.; Park, P. W.; Guardiola, F.; Codony, R. *Food Lipids and Health* **1995**, 199-240.
40. Mori, T. A.; Croft, K. D.; Puddey, I. B.; Beilin, L. J. *Redox Report* **1996**, *2*, 25-34.
41. Breuer, O.; Bjorkhem, I. *Steroids* **1990**, *55*, 185-192.
42. Smith, L. L.; Kulig, M. J.; Müller, D.; Ansari, G. A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6206-6211.
43. Teng, J. I.; Kulig, M. J.; Smith, L. L. *J. Chromatogr.* **1973**, *75*, 108-113.
44. Ozawa, N.; Yamazaki, S.; Chiba, K.; Aoyama, H.; Tomisawa, H.; Tateishi, M.; Watabe, T. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1991**, *178*, 242-247.
45. Smith, L. L. *J. Liq. Chromatogr.* **1993**, *16*, 1731-1747.
46. Chen, B. H.; Chen, Y. C. *J. Chromatogr. A* **1994**, *661*, 127-136.
47. Park, S. W.; Addis, P. B. *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 1437-1441, 1444.
48. Csallany, A. S.; Kindom, S. E.; Addis, P. B.; Lee, J. H. *Lipids* **1989**, *24*, 645-651.
49. Penazzi, G.; Caboni, M. F.; Zunin, P.; Evangelisti, F.; Tiscornia, E.; Gallina Toschi, T.; Lercker, G. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 1523-1527.
50. Sugino, K.; Terao, J.; Murakami, H.; Matsushita, S. *J. Agr. Food Chem.* **1986**, *34*, 36-39.
51. Fillion, L.; Zee, J. A.; Gosselin, C. *J. Chromatogr.* **1991**, *547*, 105-112.
52. Teng, J. I.; Smith, L. L. *J. Chromatogr. A* **1995**, *691*, 247-254.
53. Ansari, G. A. S.; Smith, L. L. *J. Chromatogr.* **1979**, *175*, 307-315.
54. Tsai, L. S.; Hudson, C. A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*, 931-934.
55. Shen, C. S. J.; Sheppard, A. J. *Chromatographia* **1983**, *17*, 469-471.
56. Higley, N. A.; Taylor, S. L.; Herian, A. M.; Lee, K. *Meat Science* **1986**, *16*, 175-188.
57. Maerker, G.; Nungesser, E. H.; Zulak, I. M. *J. Agr. Food Chem.* **1988**, *36*, 61-63.
58. Korytowski, W.; Bachowski, G. J.; Girotti, A. W. *Anal. Biochem.* **1991**, *197*, 149-156.
59. Korytowski, W.; Bachowski, G. J.; Girotti, A. W. *Anal. Biochem.* **1993**, *213*, 111-119.
60. Caboni, M. F.; Costa, A.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Lercker, G. *Chromatographia* **1997**, *46*, 151-155.
61. Lakritz, L.; Jones, K. C. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 943-946.