

DIRECTIVE DE LA COMMISSION

du 25 juillet 1980

relative à la méthode d'analyse communautaire de détermination de la teneur en acide érucique dans les huiles et graisses destinées telles quelles à l'alimentation humaine ainsi que dans les denrées alimentaires additionnées d'huiles ou de graisses

(80/891/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu la directive 76/621/CEE du Conseil, du 20 juillet 1976, relative à la fixation du taux maximal d'acide érucique dans les huiles et graisses destinées telles quelles à l'alimentation humaine ainsi que dans les denrées alimentaires additionnées d'huiles ou de graisses⁽¹⁾, et notamment son article 3,

considérant que l'article 2 de la directive 76/621/CEE prévoit que, à partir du 1^{er} juillet 1979, la teneur en acide érucique des produits visés à l'article 1^{er} de ladite directive, calculée sur leur teneur totale en acides gras dans la phase grasse, ne pourra dépasser 5 % ;

considérant que l'article 3 de la directive 76/621/CEE prévoit que la teneur en acide érucique doit être contrôlée par une méthode d'analyse communautaire ;

considérant que le règlement (CEE) n° 1470/68 de la Commission, du 23 septembre 1968, relatif à la prise et à la réduction des échantillons ainsi qu'à la détermination de la teneur en huile, en impuretés et en humidité des graines oléagineuses⁽²⁾, établit dans son annexe VI, introduite par le règlement (CEE) n° 72/77⁽³⁾, une méthode d'analyse pour la détermination de la teneur en acide érucique dans les graines de colza et de navette ; qu'il convient d'utiliser cette méthode comme méthode de présélection ;

considérant que dans les conditions normales d'analyse des huiles et des graisses par chromatographie gaz-liquide des acides gras entrant dans leur composition, il n'est pas possible de faire la distinction entre l'acide érucique et d'autres isomères de l'acide docosénoïque tels que l'acide cétoléique ;

considérant qu'il est nécessaire de déterminer le taux d'acide érucique dans les huiles, les graisses et les denrées alimentaires additionnées d'huiles ou de graisses qui peuvent contenir de l'acide cétoléique, ainsi que d'autres isomères de l'acide docosénoïque ;

considérant qu'il ne faut pas déterminer le taux d'acide érucique dans les huiles, les graisses et les denrées alimentaires additionnées d'huiles ou de

graisses dont l'analyse préliminaire révèle que la teneur totale en acides docosénoïques ou en acides cis-docosénoïques ne dépasse pas 5 % ;

considérant que, en attendant la mise au point d'une méthode d'analyse de détermination de l'acide érucique plus exacte, cette méthode d'analyse est considérée comme étant la plus appropriée pour l'instant ;

considérant que les mesures prévues à la présente directive sont conformes à l'avis du comité permanent des denrées alimentaires,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE :

Article premier

Les États membres prescrivent que les analyses nécessaires à la détermination de la teneur en acide érucique des produits visés à l'article 1^{er} de la directive 76/621/CEE sont effectuées conformément à l'article 2.

Article 2

1. Est déterminée, à titre de présélection :
 - a) soit la teneur totale des produits visés à l'article 1^{er} en acides gras docosénoïques, par la méthode décrite à l'annexe VI du règlement (CEE) n° 1470/68 ;
 - b) soit la teneur totale des produits visés à l'article 1^{er} en acides gras cis-docosénoïques, par la méthode décrite à l'annexe VI du règlement (CEE) n° 1470/68 en utilisant la chromatographie gaz-liquide dans des conditions telles que les isomères cis et trans des acides docosénoïques soient séparés ; les phases stationnaires adéquates utilisées pour cette analyse sont par exemple du type « cyanopropylpolysiloxane » ou des cristaux liquides.
2. Si la teneur totale :
 - a) en acides gras docosénoïques, déterminée conformément au paragraphe 1 sous a)

ou
 - b) en acides gras cis-docosénoïques, déterminée conformément au paragraphe 1 sous b)

⁽¹⁾ JO n° L 202 du 28. 7. 1976, p. 35.

⁽²⁾ JO n° L 239 du 28. 9. 1968, p. 2.

⁽³⁾ JO n° L 12 du 15. 1. 1977, p. 11.

des produits visés à l'article 1^{er}, calculée sur leur teneur totale en acides gras dans la phase grasse, ne dépasse pas 5 %, aucune autre détermination n'est requise. Dans le cas contraire, la teneur en acide érucique est déterminée par la méthode décrite à l'annexe de la présente directive.

Article 3

Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive au plus tard le 1^{er} février 1982. Ils en informent immédiatement la Commission.

Article 4

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 25 juillet 1980.

Par la Commission

Étienne DAVIGNON

Membre de la Commission

ANNEXE

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN ACIDE ÉRUCIQUE DANS LES HUILES ET GRAISSES DESTINÉES TELLES QUELLES À L'ALIMENTATION HUMAINE AINSI QUE DANS LES DENRÉES ALIMENTAIRES ADDITIONNÉES D'HUILES OU DE GRAISSES**I. INTRODUCTION****1. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON****1.1. Généralités**

La masse de l'échantillon de laboratoire destiné à l'analyse doit être normalement de 50 g à moins qu'une quantité plus importante soit nécessaire.

1.2. Préparation de l'échantillon

L'échantillon doit être homogénéisé avant l'analyse.

1.3. Conservation

L'échantillon ainsi préparé doit toujours être conservé dans un récipient hermétique.

2. RÉACTIFS**2.1. Eau**

2.1.1. Lorsqu'il est fait mention d'eau pour les solutions, les dilutions et les lavages, il s'agit toujours d'eau distillée ou d'eau déminéralisée de pureté au moins équivalente.

2.1.2. Lorsqu'il est fait mention d'une « solution » ou d'une « dilution », sans autre indication de réactif, il s'agit d'une solution ou dilution aqueuse.

2.2. Produits chimiques

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique sauf spécifications contraires.

3. APPAREILLAGE**3.1. Liste de l'appareillage**

La liste de matériel fait référence à un équipement à usage spécialisé et avec des spécifications particulières.

3.2. Balance analytique

La balance analytique signifie une balance à sensibilité de 0,1 mg ou mieux.

4. EXPRESSION DES RÉSULTATS**4.1. Résultats**

Le résultat mentionné sur le bulletin d'analyse est la valeur moyenne obtenue à partir de deux déterminations au moins, dont la répétabilité est satisfaisante.

4.2. Calcul du pourcentage

Sauf dispositions particulières, les résultats sont exprimés en pourcentage (m/m) des acides gras totaux dans l'échantillon, tel qu'il est parvenu au laboratoire.

4.3. Nombre de chiffres significatifs

Le résultat ne doit pas comporter plus de chiffres significatifs que ne le permet la précision de la méthode.

II. DÉTERMINATION DE L'ACIDE ÉRUCIQUE

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION DE LA MÉTHODE

La méthode permet de déterminer la teneur en acide érucique dans :

- a) les huiles et les graisses contenant de l'acide céroléique (un isomère cis de l'acide docosénoïque qui se trouve dans les huiles de poisson)
et
- b) les huiles et les graisses hydrogénées contenant des isomères cis et trans de l'acide docosénoïque.

2. DÉFINITION

Teneur en acide érucique : acide érucique déterminé par la méthode indiquée ci-après.

3. PRINCIPE

Séparation des esters méthyliques des acides gras par chromatographie à basse température sur couche mince à absorbant traité au nitrate d'argent et détermination quantitative des esters ainsi séparés par chromatographie gaz-liquide.

4. RÉACTIFS

- 4.1. Éther diéthylique fraîchement distillé, sans peroxyde.
- 4.2. n-Hexane.
- 4.3. Silica-gel G, pour chromatographie sur couche mince.
- 4.4. Silica-gel, pour chromatographie sur colonne.
- 4.5. Solution de nitrate d'argent à 200 g/l. Dissoudre 24 g de nitrate d'argent dans de l'eau et ajuster le volume à 120 ml avec de l'eau.
- 4.6. Solution d'érucate de méthyle à 5 mg/ml. Dissoudre 50 mg d'érucate de méthyle dans quelques ml de n-Hexane et porter à un volume de 10 ml avec du n-Hexane.
- 4.7. Solution étalon interne de tétracosanoate de méthyle à 0,25 mg/ml. Dissoudre 25 mg de tétracosanoate de méthyle dans quelques ml de n-Hexane (comme au point 4.6) et porter à un volume de 100 ml avec du n-Hexane.
- 4.8. Solvant de développement : toluène et n-Hexane dans un rapport de 90 à 10 (v/v).
- 4.9. Solution de 2,7 dichlorofluorescéine à 0,5 g/l. Dissoudre en chauffant et en agitant 50 mg de 2,7 dichlorofluorescéine dans 100 ml d'une solution aqueuse contenant 50 % de méthanol.

5. APPAREILLAGE

- 5.1. Appareil de chromatographie sur couche mince comprenant notamment :
 - 5.1.1. une unité de congélation capable de maintenir la cuve de développement et son contenu à une température de moins 20 à moins 25 °C ;
 - 5.1.2. des plaques de verre de 200 mm × 200 mm ;
 - 5.1.3. une lampe à rayons ultraviolets ;
 - 5.1.4. des colonnes en verre de 200 mm de long et dont le diamètre intérieur est de 10 mm munies de filtres en laine de verre ou en verre fritté, ou bien petits entonnoirs munis de filtres en verre fritté ;
 - 5.1.5. un applicateur pour déposer les solutions sous la forme d'une bande mince ou d'une ligne.
- 5.2. Appareil de chromatographie gaz-liquide couplé avec un intégrateur électronique, comme décrit à la section III de l'annexe VI du règlement (CEE) n° 72/77.

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1. Préparation des esters méthyliques d'acide gras

Prendre un échantillon type d'environ 400 mg de la graisse ou de l'huile à analyser et préparer une solution contenant environ 20 à 50 mg/ml d'esters méthyliques d'acides gras dans l'hexane, en suivant la méthode exposée à la section II point 3 de l'annexe VI du règlement (CEE) n° 72/77.

6.2. Chromatographie sur couche mince

6.2.1. Préparation des plaques

Placer 60 g de silica-gel (point 4.3) dans un ballon à fond rond d'une capacité de 500 ml. Ajouter 120 ml de la solution de nitrate d'argent (point 4.5) et agiter durant une minute pour obtenir une pâte tout à fait homogène. Étaler celle-ci de la manière habituelle sur les plaques et ajuster l'épaisseur de la couche à 0,5 mm. Cette quantité de pâte est suffisante pour la préparation de 5 plaques de 200 mm × 200 mm. Sécher partiellement les plaques à l'air (de préférence dans l'obscurité durant 30 mn) et ensuite les sécher et les activer dans un four à 100 °C durant 2 h 30. Les plaques doivent être utilisées dès que possible après la phase d'activation, sinon elles doivent être rangées soigneusement dans une armoire à l'abri de la lumière et activées à nouveau avant l'emploi. Avant l'emploi tracer des sillons à travers le substrat à 10 mm des côtés et du haut de chaque plaque, afin de diminuer les effets marginaux durant le développement. *Note* : l'activation à 110 °C durant 1 h peut se révéler satisfaisante à condition que les plaques ne soient pas noircies.

6.2.2. Application des esters méthyliques

À l'aide de l'applicateur (point 5.1.5), déposer 50 µl de la solution d'esters méthyliques préparée à partir de l'échantillon à analyser (point 6.1) sur une fine ligne d'environ 50 mm de long, à au moins 40 mm des côtés et 10 mm du bas de la plaque. Appliquer de la même façon 100 µl d'une solution contenant des volumes égaux de la solution d'esters méthyliques (point 6.1) et de la solution d'érucate de méthyle (point 4.6). L'application des solutions exige un soin particulier étant donné la fragilité du substrat. Après l'application des esters méthyliques, le bas de la plaque peut être placé dans l'éther diéthylique jusqu'à ce que ce dernier monte à environ 5 mm au-dessus de la zone d'application de l'échantillon à analyser. Cette opération concentrera les esters méthyliques sur une bande étroite. *Note* : Si on le désire, on peut appliquer 50 µl de la solution d'érucate de méthyle (point 4.6) sur la plaque, afin d'aider à l'identification de la bande d'érucate de méthyle après développement (voir figure).

6.2.3. Développement des plaques

Verser une quantité suffisante de solvant (point 4.8) dans la cuve de façon à avoir une profondeur d'environ 5 mm et placer la cuve munie de son couvercle dans un congélateur (point 5.1.1) à moins 25 °C ou à une température avoisinante (dans certains cas, il peut être utile de protéger les parois de la cuve à l'aide d'un revêtement). Après 2 h, placer avec précaution la plaque dans la cuve et laisser monter le solvant jusqu'à ce qu'il atteigne une zone située entre la moitié et les deux tiers de la hauteur de la plaque. Retirer alors la plaque et évaporer doucement le solvant à l'aide d'un courant d'azote. Replacer la plaque dans la cuve et laisser monter le solvant jusqu'à l'extrémité supérieure de la plaque. Retirer alors la plaque et la sécher à nouveau à l'aide d'un courant d'azote, ensuite la vaporiser avec la solution de 2,7 dichlorofluorescéine (point 4.9).

Lors de l'examen à la lumière ultraviolette, on peut localiser la bande d'érucate de méthyle présent dans l'échantillon en se référant à la bande plus intense de l'échantillon auquel on a ajouté de l'érucate de méthyle (voir figure).

6.2.4. Séparation des fractions d'esters méthyliques

Gratter quantitativement la bande d'érucate de méthyle provenant de l'échantillon dans un bêcher d'une capacité de 50 ml. Dans un autre bêcher de 50 ml, gratter quantitativement le silica-gel qui se trouve en dessus et en dessous de la bande d'érucate de méthyle et qui contient toutes les autres fractions d'esters méthyliques d'acides gras. Dans chacun des deux bêchers, ajouter 1,0 ml de la solution étalon de tétracosonate de méthyle (point 4.7) et 10 ml d'éther diéthylique (point 4.1). Agiter et transférer séparément le contenu des bêchers dans les colonnes ou filtres (point 5.1.4) contenant environ 1 g de silica-gel (point 4.4) et extraire trois ou quatre fois les esters à l'aide de 10 ml d'éther diéthylique. Recueillir les filtrats dans de petits ballons. Après avoir évaporé une partie du solvant sous un faible courant d'azote, transférer les esters méthyliques dans de petits tubes de verre à fond pointu. Évaporer le reste du solvant sous azote de façon à concentrer les esters méthyliques au fond des tubes. Dissoudre les esters méthyliques dans 25 à 50 µl d'hexane (point 4.2).

6.3. Chromatographie gaz-liquide

6.3.1. Suivre le mode opératoire décrit dans la section III de l'annexe VI du règlement (CEE) n° 72/77 et injecter 1 à 2 µl des solutions d'esters méthyliques obtenues à partir (i) de la fraction contenant l'érucate de méthyle et (ii) des fractions contenant le reste des esters méthyliques d'acides gras.

6.3.2. Les surfaces de pics fournies par l'intégrateur électronique sont les suivantes :

i) à partir du chromatogramme de la fraction contenant l'érucate de méthyle :

- a) érucate de méthyle [E]
- b) étalon interne [L₁]
- c) surfaces totales des pics des esters méthyliques à l'exclusion de l'étalon interne [EF];

ii) à partir du chromatogramme de la fraction contenant le reste des esters méthyliques d'acides gras :

- a) surfaces totales des pics, à l'exclusion de l'étalon interne [RF]
- b) étalon interne [L₂].

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

7.1. Méthode de calcul et formule

7.1.1. La teneur en acide érucique de l'échantillon, exprimée comme ester méthylique en pourcent de la teneur en esters méthyliques des acides gras totaux de l'échantillon, est donnée par la formule :

$$L_1 \frac{E}{\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2} \right)} \times 100$$

où

E, EF, RF, L₁ et L₂ sont les surfaces de pics définies au point 6.3.2, corrigées si nécessaire à l'aide de facteurs d'étalonnage. La teneur en érucate de méthyle obtenue par la formule ci-avant, est équivalente au taux d'acide érucique, exprimé en pourcent de la teneur totale en acides gras.

7.1.2. Si la surface des pics est exprimée en pourcent, calculer comme suit les valeurs EF et RF :

$$EF = 100 - L_1$$

$$RF = 100 - L_2$$

7.1.3. Le mode de calcul (point 7.1.1) suppose que le taux d'acide tétracosanoïque dans l'échantillon est négligeable. Lorsqu'une certaine quantité de cet acide est présente, la valeur en acide tétracosanoïque (L₂) obtenue par le chromatogramme des fractions contenant les autres esters méthyliques d'acides gras peut être réduite à :

$$L_2 - T_2$$

où

$$T_2 = \frac{T_0 P_2}{P_0}$$

et

T₂ = la surface de pic de l'ester méthylique de l'acide tétracosanoïque provenant de l'échantillon qui constitue une partie de la surface de pic imputée à l'étalon interne du chromatogramme de la fraction restante des esters méthyliques d'acides gras,

P₂ = la surface de pic de l'ester méthylique de l'acide palmitique obtenue du chromatogramme de la fraction restante,

T₀ = la surface de pic de l'ester méthylique de l'acide tétracosanoïque obtenue du chromatogramme des esters méthyliques des acides gras totaux déterminé par l'analyse reprise à l'article 2 de la présente directive,

P₀ = la surface de pic de l'ester méthylique de l'acide palmitique obtenue du chromatogramme des esters méthyliques des acides gras totaux déterminé par l'analyse reprise à l'article 2 de la présente directive.

7.1.4. *Origine de la formule*

La teneur en acide gras de la fraction contenant l'érucate de méthyle, exprimée en pourcent de la teneur totale en acides gras dans l'échantillon, est donnée par :

$$\frac{\frac{EF}{L_1}}{\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}} \times 100 \quad \text{ou} \quad L_1 \frac{EF}{\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times 100.$$

La teneur en acide érucique de la fraction contenant l'érucate de méthyle est donnée par :

$$\frac{E}{EF}$$

D'où la teneur en acide érucique de l'échantillon, exprimée en pourcent de la teneur totale en acide gras, est donnée par :

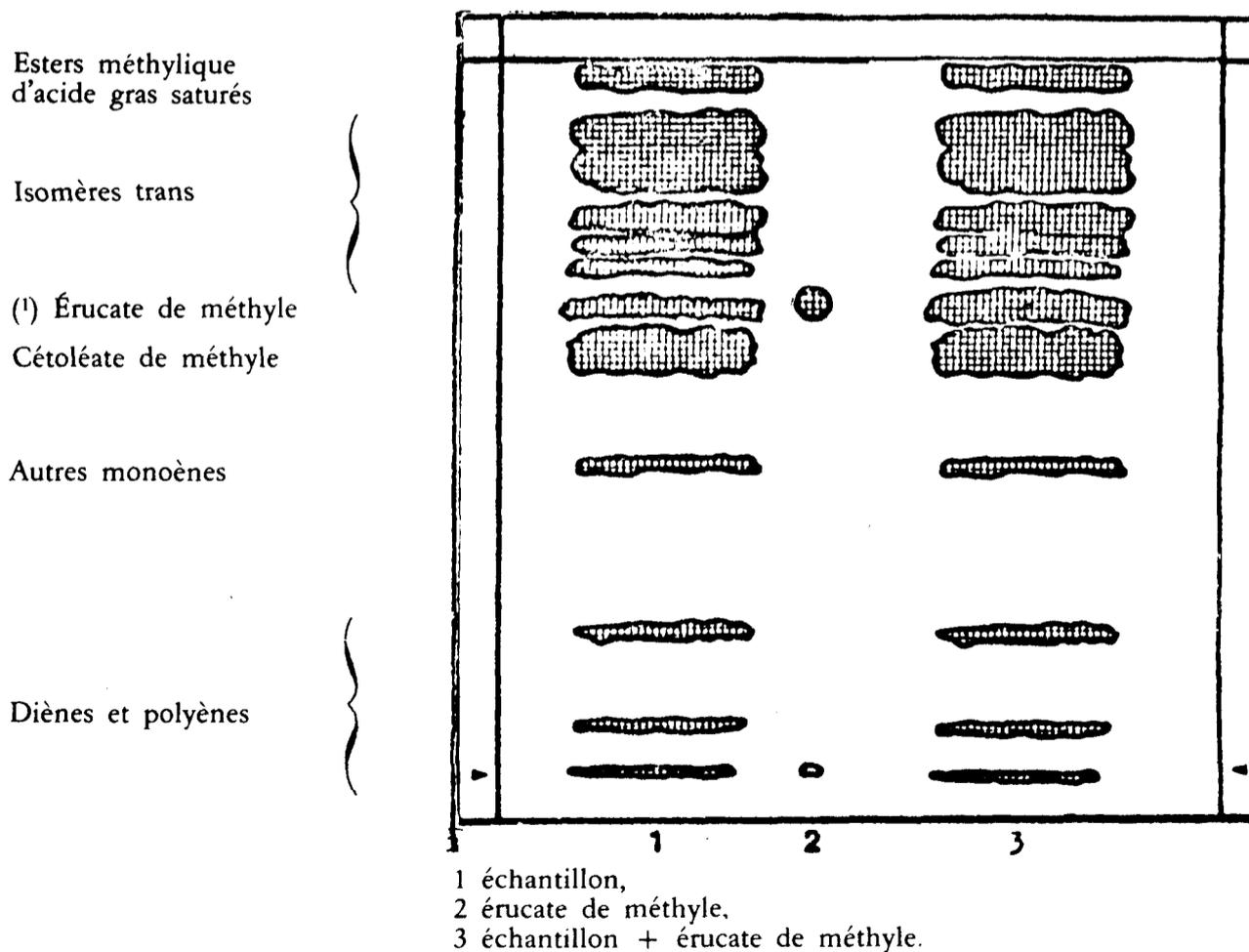
$$L_1 \frac{EF}{\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times \frac{E}{EF} \times 100 \quad \text{ou} \quad L_1 \frac{E}{\left(\frac{EF}{L_1} + \frac{RF}{L_2}\right)} \times 100.$$

7.1.5. *Répétabilité*

La différence entre les résultats de deux déterminations parallèles effectuées simultanément dans les mêmes conditions par le même analyste sur le même échantillon ne doit dépasser 10 % en valeur relative de la valeur déterminée ou 0,5 g pour 100 g d'échantillon en valeur absolue en prenant la valeur la plus élevée.

FIGURE

Chromatogramme type sur couche mince montrant la séparation des esters méthyliques de l'acide érucique, de l'acide cétoléique et des isomères trans de l'acide docosénoïque



(¹) La fraction qualifiée d'érucate de méthyle contiendra normalement des esters méthyliques d'autres acides monoénoïques mais devrait être exempte de cétoleate de méthyle.