

Ce document constitue un outil de documentation et n'engage pas la responsabilité des institutions

► **B**

RÈGLEMENT (CEE) N° 2568/91 DE LA COMMISSION

du 11 juillet 1991

► **C1** relatif aux caractéristiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi qu'aux méthodes d'analyse y afférentes ◀

(JO L 248 du 5.9.1991, p. 1)

Modifié par:

	Journal officiel		
	n°	page	date
► <u>M1</u> Règlement (CEE) n° 3682/91 de la Commission du 17 décembre 1991	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u> Règlement (CEE) n° 1429/92 de la Commission du 26 mai 1992	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u> Règlement (CEE) n° 1683/92 de la Commission du 29 juin 1992	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u> Règlement (CEE) n° 1996/92 de la Commission du 15 juillet 1992	L 199	18	18.7.1992
► <u>M5</u> Règlement (CEE) n° 3288/92 de la Commission du 12 novembre 1992	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u> Règlement (CEE) n° 183/93 de la Commission du 29 janvier 1993	L 22	58	30.1.1993
► <u>M7</u> Règlement (CEE) n° 620/93 de la Commission du 17 mars 1993	L 66	29	18.3.1993

Rectifié par:

- **C1** Rectificatif, JO L 347 du 28.11.1992, p. 69 (2568/91)
- **C2** Rectificatif, JO L 176 du 20.7.1993, p. 26 (183/93)

▼B

RÈGLEMENT (CEE) N° 2568/91 DE LA COMMISSION
du 11 juillet 1991

► **C1** relatif aux caractéristiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi qu'aux méthodes d'analyse y afférentes ◄

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu le règlement n° 136/66/CEE du Conseil, du 22 septembre 1966, portant établissement d'une organisation commune des marchés dans le secteur des matières grasses⁽¹⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 3577/90⁽²⁾, et notamment son article 35 *bis*,

considérant que l'annexe du règlement n° 136/66/CEE prévoit les dénominations et définitions des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive commercialisées à l'intérieur de chaque État membre ainsi que dans les échanges intracommunautaires et avec les pays tiers;

considérant que, pour pouvoir distinguer les divers types d'huile, il y a lieu de définir les caractéristiques physico-chimiques de chacun d'eux ainsi que les caractéristiques organoleptiques des huiles vierges, de manière à assurer la pureté et la qualité des produits en cause, sans préjudice d'autres dispositions existant en la matière;

considérant qu'il convient de déterminer de manière uniforme dans toute la Communauté la présence des caractéristiques des différents types d'huile; que, à cette fin, il y a lieu d'établir les méthodes communautaires d'analyse chimique et d'appréciation organoleptique; qu'il convient cependant de permettre, pendant une période transitoire, l'utilisation d'autres méthodes d'analyse appliquées dans les États membres, tout en prévoyant que, en cas de divergence des résultats, ceux obtenus selon la méthode commune soient déterminants;

considérant que la définition des caractéristiques physico-chimiques des huiles d'olives et des méthodes d'analyse entraîne l'adaptation des notes complémentaires du chapitre 15 de la nomenclature combinée;

considérant que la méthode d'évaluation des caractéristiques organoleptiques des huiles vierges comporte la création de jurys de dégustateurs sélectionnés et entraînés; qu'il convient, dès lors, de prévoir le délai nécessaire pour la mise en place d'une telle structure; que, compte tenu des difficultés que rencontreront certains États membres pour la constitution des jurys de dégustateurs, il convient d'autoriser le recours aux jurys existant dans d'autres États membres;

considérant que, pour assurer le fonctionnement correct du système des prélèvements applicables à l'importation de grignons d'olive, il convient de prévoir une méthode unique pour la détermination de la teneur en huile de ces produits;

considérant que, pour ne pas causer un préjudice au commerce, il est opportun de prévoir une période limitée pour l'écoulement de l'huile conditionnée avant l'entrée en vigueur du présent règlement;

considérant qu'il y a lieu d'abroger le règlement (CEE) n° 1058/77 de la Commission⁽³⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 1858/88⁽⁴⁾;

considérant que le comité de gestion des matières grasses n'a pas émis d'avis dans le délai imparti par son président,

⁽¹⁾ JO n° 172 du 30. 9. 1966, p. 3025/66.

⁽²⁾ JO n° L 353 du 17. 12. 1990, p. 23.

⁽³⁾ JO n° L 128 du 24. 5. 1977, p. 6.

⁽⁴⁾ JO n° L 166 du 1. 7. 1988, p. 10.

▼B

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

1. Sont considérées comme huiles d'olive vierges au sens du point 1 a), b) et c) de l'annexe du règlement n° 136/66/CEE, les huiles dont les caractéristiques respectives sont conformes à celles indiquées à l'annexe I points 1, 2 et 3 du présent règlement.
2. Est considérée comme huile d'olive vierge lampante au sens du point 1 d) de l'annexe du règlement n° 136/66/CEE, l'huile dont les caractéristiques sont conformes à celles indiquées à l'annexe I point 4 du présent règlement.
3. Est considérée comme huile d'olive raffinée au sens du point 2 de l'annexe du règlement n° 136/66/CEE, l'huile dont les caractéristiques sont conformes à celles indiquées à l'annexe I point 5 du présent règlement.
4. Est considérée comme huile d'olive au sens du point 3 de l'annexe du règlement n° 136/66/CEE, l'huile dont les caractéristiques sont conformes à celles indiquées à l'annexe I point 6 du présent règlement.
5. Est considérée comme huile de grignons d'olive brute au sens du point 4 de l'annexe du règlement n° 136/66/CEE, l'huile dont les caractéristiques sont conformes à celles indiquées à l'annexe I point 7 du présent règlement.
6. Est considérée comme huile de grignons d'olive raffinée au sens du point 5 de l'annexe du règlement n° 136/66/CEE, l'huile dont les caractéristiques sont conformes à celles indiquées à l'annexe I point 8 du présent règlement.
7. Est considérée comme huile de grignons d'olive au sens du point 6 de l'annexe du règlement n° 136/66/CEE, l'huile dont les caractéristiques sont conformes à celles indiquées à l'annexe I point 9 du présent règlement.

Article 2

1. La détermination des caractéristiques des huiles prévues à l'annexe I est effectuée selon les méthodes d'analyse suivantes:
 - pour la détermination des acides gras libres, exprimés en pourcentage d'acide oléique, la méthode reprise à l'annexe II,
 - pour la détermination de l'indice de peroxyde, la méthode reprise à l'annexe III,
 - pour la détermination des alcools aliphatiques, la méthode reprise à l'annexe IV,
 - pour la détermination du contenu en stérols, la méthode reprise à l'annexe V,
 - pour la détermination de l'érythrodiol et de l'uvaol, la méthode reprise à l'annexe VI,
 - pour la détermination des acides gras saturés en position 2 du triglycéride, la méthode reprise à l'annexe VII,
 - pour la détermination de la teneur en trilinoléine, la méthode reprise à l'annexe VIII,
 - pour l'analyse spectrophotométrique, la méthode reprise à l'annexe IX,
 - pour la détermination de la composition en acides gras, la méthode reprise aux annexes X «A» et X «B».
 - pour la détermination des solvants halogénés volatils, la méthode reprise à l'annexe XI,
 - pour l'appréciation des caractéristiques organoleptiques des huiles d'olive vierges, la méthode reprise à l'annexe XII, appliquée conformément au paragraphe 2,
 - pour la preuve du raffinage, la méthode reprise à l'annexe XIII.
2. ►**M3** L'analyste expert en analyse sensorielle ou assisté d'experts ◀, procède à l'appréciation des caractéristiques organoleptiques selon la procédure décrite dans la fiche de dégustation visée à

▼B

l'annexe XII. Au cas où l'analyste détermine les caractéristiques organoleptiques différentes de celles résultant de la dénomination du produit, il est tenu de faire examiner l'échantillon par un jury de dégustateurs conformément aux dispositions de l'annexe XII. Toute analyse de révision est effectuée par le jury de dégustateurs conformément à ces dispositions.

Pour l'appréciation des caractéristiques organoleptiques lors des opérations liées au régime d'intervention, le jury de dégustateurs procède à cette appréciation conformément à l'annexe XII.

Article 3

Jusqu'au ►**M6** 28 février 1993 ◀, l'introduction des méthodes d'analyse prévues à l'article 2 ne fait pas obstacle à ce que les États membres utilisent d'autres méthodes éprouvées et scientifiquement valables, à condition que la libre circulation des produits reconnus conformes à la réglementation en application des méthodes communautaires n'en soit pas entravée. Les États membres concernés communiquent ces autres méthodes à la Commission avant de les utiliser.

Dans le cas où l'une de ces autres méthodes donne un résultat différent de celui déterminé par la méthode communautaire, le résultat obtenu en application de la méthode commune est retenu.

▼M5*Article 3 bis*

En cas de divergence sur les caractéristiques organoleptiques d'une huile faisant l'objet de transactions commerciales, les parties concernées peuvent s'adresser à un jury de dégustateurs agréé, de leur choix.

Article 3 ter

Au cas où il est constaté que les caractéristiques organoleptiques d'une huile sont différentes de celles résultant de sa dénomination, l'État membre concerné applique, sans préjudice des autres sanctions éventuelles, des sanctions pécuniaires administratives, dont le montant est déterminé en fonction de la gravité de l'irrégularité constatée.

Aux fins de l'évaluation de l'irrégularité, il est tenu compte, notamment, de l'évolution naturelle des caractéristiques d'une huile qui a été conservée dans des conditions normales.

Les États informent la Commission, au début de chaque semestre, du nombre et de la nature des irrégularités constatées ainsi que des sanctions appliquées au cours du semestre précédent.

Article 4

1. Aux fins de l'appréciation des caractéristiques organoleptiques, les États membres instituent des jurys de dégustateurs chargés du contrôle officiel de ces caractéristiques, qui doivent répondre aux conditions suivantes:

- être constitué de dégustateurs sélectionnés et entraînés selon les règles prévues par la méthode visée à l'annexe XII,
- posséder les installations et le matériel nécessaires à l'évaluation organoleptique conformément aux règles prévues par la méthode précitée,
- utiliser le vocabulaire spécifique à l'analyse sensorielle de l'huile d'olive, la feuille de profil et la table de notation prévus par ladite méthode,
- s'engager à réaliser les évaluations organoleptiques prévues sur le plan communautaire ou international lors de contrôles périodiques et de sessions d'harmonisation de critères de perception,
- s'engager à fournir annuellement à la Commission tous renseignements sur les modifications intervenues dans la constitution du jury et le nombre d'évaluations réalisées en tant que jury agréé.

▼ M5

Chaque État membre procède à l'agrément des jurys répondant aux conditions décrites ci-dessus et qui ont été constituées sur son territoire. Il désigne parmi eux un ou plusieurs jurys chargés des analyses de révision.

Les jurys institués par les États membres avant le 1^{er} novembre 1992 selon les règles prévues par la méthode visée à l'annexe XII sont considérés comme agréés au sens du présent article.

Chaque État membre communique la liste des jurys agréés à la Commission ainsi qu'aux États membres.

2. Au cas où un État membre rencontre des difficultés pour instituer un jury de dégustateurs sur son territoire, il peut recourir à un jury de dégustateurs agréé dans un autre État membre.

3. Chaque État membre établit la liste des jurys de dégustateurs institués par des organisations professionnelles ou interprofessionnelles conformément aux conditions décrites au paragraphe 1 et veille au respect de ces conditions.

▼ M6*Article 5*

Les notes complémentaire 2, 3 et 4 du chapitre 15 de la nomenclature combinée figurant à l'annexe I du règlement (CEE) n° 2658/87 du Conseil⁽¹⁾ sont remplacées par le texte figurant à l'annexe XIV du présent règlement.

▼ B*Article 6*

1. La teneur en huile des grignons et des autres résidus de l'extraction de l'huile relevant des codes NC 2306 90 11 et 2306 90 19 est déterminée conformément à la méthode figurant à l'annexe XV.

2. la teneur en huile visée au paragraphe 1 est exprimée en pourcentage de son poids rapporté à celui de la matière sèche.

Article 7

Les dispositions communautaires concernant la présence de substances indésirables autres que celles visées à l'annexe XI sont applicables.

Article 8

1. Les États membres communiquent à la Commission les mesures prises pour l'application du présent règlement.

2. Les États membres communiquent à la Commission, au début de chaque semestre, un état récapitulatif des données analytiques des déterminations effectuées au cours du semestre précédent.

Ces résultats sont examinés par le comité de gestion des matières grasses selon la procédure prévue à l'article 39 du règlement n° 136/66/CEE.

Article 9

Le règlement (CEE) n° 1058/77 est abrogé.

Article 10

1. Le présent règlement entre en vigueur le jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*. Toutefois, la méthode reprise à l'annexe XII est mise en application à partir du ► **M1** 1^{er} novembre 1992 ◀, sauf en ce qui concerne les opérations liées à l'intervention.

(1) JO n° L 256 du 7. 9. 1987, p. 1.

▼ M5

Cette méthode ne s'applique pas aux huiles d'olive vierges conditionnées avant le 1^{er} novembre 1992.

▼ B

2. Le présent règlement ne s'applique pas aux huiles d'olive et de grignons d'olive conditionnées avant la date d'entrée en vigueur du présent règlement et commercialisées jusqu'au 31 octobre 1992.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

▼B*ANNEXES***Sommaire**

Annexe I:	Caractéristiques des huiles d'olive ...
Annexe II:	Détermination des acides gras libres ...
Annexe III:	Détermination de l'indice de peroxyde ...
Annexe IV:	► M6 Détermination de la teneur en cires au moyen de la chromatographie en phase gazeuse avec colonne capillaire ◀ ...
Annexe V:	Détermination de la composition et du contenu en stérols au moyen de la chromatographie en phase gazeuse avec colonne capillaire ...
Annexe VI:	Détermination de la teneur en érythrodiol et en uvaol ...
Annexe VII:	Détermination des acides gras saturés en position 2 des triglycérides ...
Annexe VIII:	Détermination de la teneur en trilinoléine ...
Annexe IX:	Analyse spectrophotométrique ...
Annexe X «A»:	Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras ...
Annexe X «B»:	Préparation des esters méthyliques d'acides gras ...
Annexe XI:	Détermination de la teneur en solvants halogénés volatils dans l'huile d'olive ...
Annexe XII:	Évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge ...
Annexe XIII:	► M6 Neutralisation et décoloration de l'huile d'olive en laboratoire ◀ ...
Annexe XIV:	Notes complémentaires 2, 3 et 4 du chapitre 15 de la nomenclature combinée ...
Annexe XV:	Teneur en huile des grignons d'olive ...
Annexe XVI:	Détermination de l'indice d'iode ...

ANNEXE I

CARACTÉRISTIQUES DES HUILES D'OLIVE

Catégorie	Acidité (%)	Indice de peroxyde (mEq/O ₂ /kg)	Solvants halogénés (mg/kg) (1)	Cires (mg/kg)	Acides saturés en position 2 du triglycéride (%)	Érythrodiol et uvaol (%)	Trilinoléine (%)	Cholestérol (%)	Brassicastérol (%)	Campésterol (%)	Stigmasterol (%)	Bétagésterol (%) (2)	Delta-7-Stigmasterol (%)	Sterols totaux (mg/kg)
1. Huile d'olive vierge extra	M 1,0	M 20	M 0,20	M 250	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
2. Huile d'olive vierge	M 2,0	M 20	M 0,20	M 250	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
3. Huile d'olive vierge courante	M 3,3	M 20	M 0,20	M 250	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
4. Huile d'olive vierge lampante	> 3,3	> 20	> 0,20	▲ C2 M 350 ▼	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 1 000
5. Huile d'olive raffinée	M 0,5	M 10	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
6. Huile d'olive	M 1,5	M 15	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
7. Huile de grignons d'olive brute	m 2,0	—	—	—	M 1,8	m 12	▲ M7 M 0,7 ▼	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 2 500
8. Huile de grignons d'olive raffinée	M 0,5	M 10	M 0,20	—	M 2,0	m 12	▲ M7 M 0,6 ▼	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800
9. Huile de grignons d'olive	M 1,5	M 15	M 0,20	> 350	M 2,0	> 4,5	▲ M7 M 0,6 ▼	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800

M = maximum, m = minimum.

(1) Limite maximale totale pour les composés détectés par détecteur à capture d'électrons. Pour les composants détectés individuellement, la limite maximale est de 0,10 mg/kg.

(2) Delta-5,23-Stigmastadiénol + Cholestérol + Béta-sitostérol + Sitostanol + Delta-5-Avenastérol + Delta-5,24-Stigmastadiénol.

Notes: Il suffit qu'une seule caractéristique ne soit pas conforme aux valeurs indiquées pour que l'huile soit changée de classe ou déclarée non conforme quant à sa pureté.

▼ M2

Catégorie	Teneur en acides						Somme des isomères transoléiques %	Somme des isomères trans/inoléiques+trans/inoléiques %	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₇₀ après alumine +	Delta K	Panel test
	Myristique %	Linoléique %	Arachidique %	Éicosanoïque %	Béniénique %	Lignocé-rique %							
1. Huile d'olive vierge extra	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,03	M 2,40	M 0,20	M 0,10	M 0,01	≥ 6,5	
2. Huile d'olive vierge	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,03	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 5,5	
3. Huile d'olive vierge courante	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,03	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 3,5	
4. Huile d'olive vierge lampante	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,10	M 3,70	> 0,25	M 0,11	—	< 3,5	
5. Huile d'olive raffinée	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,30	M 3,40	M 1,20	—	M 0,16	—	
6. Huile d'olive	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,30	M 3,30	M 1,00	—	M 0,13	—	
7. Huile de grignons d'olive brute	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,10	—	—	—	—	—	
8. Huile de grignons d'olive raffinée	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,35	M 5,50	M 2,50	—	M 0,25	—	
9. Huile de grignons d'olive	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,35	M 5,30	M 2,00	—	M 0,20	—	

Note: Aux fins de l'établissement de la pureté, lorsque le K₂₇₀ dépasse la limite de la catégorie, il faut procéder à la détermination du K₂₇₀ après passage sur alumine.

▼ M6



ANNEXE II

DÉTERMINATION DES ACIDES GRAS LIBRES

1. OBJET

Détermination des acides gras libres dans les huiles d'olive. La teneur en acides gras libres est exprimée par l'acidité calculée conventionnellement.

1.1. Principe

Mise en solution d'une prise d'essai dans un mélange de solvants, puis titrage des acides gras libres présents à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium.

1.2. Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de pureté équivalente.

1.2.1. Oxyde diéthylique éthanol à 95 % (V/V), mélange 1-1 en volume.

Note: L'oxyde diéthylique est très inflammable et peut former des peroxydes explosifs. Il doit être utilisé en prenant des précautions particulières.

Neutraliser exactement au moment de l'emploi avec la solution d'hydroxyde de potassium (1.2.2) en présence de 0,3 millilitre de la solution de phénolphthaléine (1.2.3) pour 100 millilitres de mélange.

Note: S'il n'est pas possible d'utiliser l'oxyde diéthylique, un mélange de solvants formé d'éthanol et de toluène peut être utilisé. Si nécessaire, l'éthanol peut être remplacé par le propanol 2.

1.2.2. Hydroxyde de potassium, solution éthanolique titrée $c(\text{KOH}) - 0,1$ mole par litre environ ou, si nécessaire, $c(\text{KOH}) - 0,5$ mole par litre environ.

La concentration exacte de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium doit être connue et vérifiée immédiatement avant l'emploi. Utiliser une solution préparée au moins cinq jours avant emploi et décantée dans un flacon en verre brun fermé avec un bouchon de caoutchouc. La solution doit être incolore ou jaune paille.

Note: Une solution incolore stable d'hydroxyde de potassium peut être préparée de la façon suivante. Porter et maintenir durant une heure à ébullition à reflux 1 000 millilitres d'éthanol avec 8 grammes d'hydroxyde de potassium et 0,5 gramme de rognures d'aluminium. Distiller immédiatement. Dissoudre dans le distillat la quantité requise d'hydroxyde de potassium. Laisser reposer durant plusieurs jours et décanter le liquide clair surnageant du précipité de carbonate de potassium.

La solution peut aussi être préparée sans distillation de la façon suivante. À 1 000 millilitres d'éthanol, ajouter 4 millilitres de butylite d'aluminium et laisser reposer le mélange durant quelques jours. Décanter le liquide surnageant et y dissoudre la quantité requise d'hydroxyde de potassium. Cette solution est prête pour l'emploi.

1.2.3. Phénolphthaléine, solution à 10 grammes par litre dans l'éthanol à 95-96 % (V/V) ou bleu alcalin (dans le cas de corps gras fortement coloré) solution à 20 grammes par litre dans l'éthanol à 95-96 % (V/V).

1.3. Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

1.3.1. Balance analytique

1.3.2. Fiole conique de 250 millilitres de capacité

1.3.3. Burette de 10 millilitres de capacité, graduée en 0,05 millilitre.

1.4. Mode opératoire

1.4.1. Préparation de l'échantillon pour essai

La détermination est effectuée sur l'échantillon filtré. Si la teneur globale en humidité et en impuretés est inférieure à 1 %, la détermination est effectuée sur l'échantillon tel quel.

▼B

1.4.2. Prise d'essai

Prélever une prise d'essai, selon l'indice d'acide présumé, d'après les indications du tableau suivant.

Indice d'acide présumé	Masse de la prise d'essai (en g)	Précision de la pesée de la prise d'essai (en g)
< 1	20	0,05
1 à 4	10	0,02
4 à 15	2,5	0,01
15 à 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Peser la prise d'essai dans la fiole conique (1.3.2).

1.4.3. Détermination

Dissoudre la prise d'essai (4.5.2) dans 50 à 150 millilitres du mélange oxyde diéthylique/éthanol (1.2.1), préalablement neutralisé.

Titre, en agitant, avec la solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mole par litre (1.2.2) (voir note 2) jusqu'à virage de l'indicateur (coloration rose de la phénolphthaléine persistant durant au moins 10 secondes).

Note 1: La solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium (1.2.2) peut être remplacée par une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium ou de sodium lorsque le volume d'eau introduit n'entraîne pas une séparation de phases.

Note 2: Si la quantité nécessaire de solution d'hydroxyde de potassium à 0,1 mole par litre dépasse 10 millilitres, utiliser une solution à 0,5 mole par litre.

Note 3: Si la solution devient trouble pendant le titrage, ajouter une quantité suffisante du mélange de solvants (1.2.1) pour donner une solution claire.

1.5. Expression de l'acidité en pourcentage de l'acide oléique

L'acidité, exprimée en pourcentage en poids, est égale à:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

où:

V: volume, en millilitres, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée;

c: concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée;

M: poids molaire, en grammes par mole, de l'acide adopté pour l'expression du résultat (= 282);

m: poids en grammes, de la prise d'essai.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique ►**M6** de deux déterminations ◀.



ANNEXE III

DÉTERMINATION DE L'INDICE DE PEROXYDE

1. OBJET

La présente norme décrit une méthode de détermination de l'indice de peroxyde dans les huiles et matières grasses.

2. CHAMP D'APPLICATION

La présente norme est applicable aux huiles et matières grasses animales et végétales.

3. DÉFINITION

L'indice de peroxyde représente la quantité des substances de l'échantillon (exprimée en milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme) qui oxydent l'iodure de potassium dans les conditions de travail décrites.

4. PRINCIPE

La prise d'essai en solution dans un mélange acide acétique et chloroforme est traitée par une solution d'iodure de potassium. L'iode libéré est titré avec une solution de thiosulfate de sodium.

5. APPAREILLAGE

Les équipements utilisés doivent être exempts de toute trace de substances oxydantes ou réductrices.

Nota bene: ne pas graisser les surfaces rodées.

5.1. Cuiller en verre de 3 millilitres.

5.2. Fioles d'environ 250 millilitres, avec col et bouchons rodés, séchées au préalable et remplies d'un gaz inerte, sec et pur (azote ou, de préférence, dioxyde de carbone).

5.3. Burette de 25 ou 50 millilitres avec graduations de 0,1 millilitre.

6. RÉACTIFS

6.1. Chloroforme de qualité analytique, exempt d'oxygène (ce dernier ayant été éliminé par barbotage d'un courant de gaz inerte, sec et pur).

6.2. Acide acétique glacial de qualité analytique, exempt d'oxygène (ce dernier ayant été éliminé par barbotage d'un courant de gaz sec et pur).

6.3. Iodure de potassium en solution aqueuse saturée de préparation récente, exempte d'iode et d'iodates.

6.4. Solution aqueuse de thiosulfate de sodium 0,01 ou 0,002 N, soigneusement normalisée juste avant l'emploi.

6.5. Solution d'amidon (dispersion aqueuse de 10 grammes par litre) récemment préparée à partir d'amidon naturel soluble.

7. ÉCHANTILLON

Veiller à ce que l'échantillon soit prélevé et stocké hors de la lumière, conservé au frais et enfermé dans des conteneurs de verre remplis entièrement et fermés hermétiquement à l'aide de bouchons de liège ou de verre rodé.

8. MODE OPÉRATOIRE

L'essai doit être réalisé sous une lumière diffuse (lumière du jour) ou artificielle. Dans une cuiller en verre (5.1) ou, à défaut, dans une fiole (5.2), peser, à 0,001 gramme près, une des masses de l'échantillon visées dans le tableau ci-après en fonction de l'indice de peroxyde prévu.

▼B

Indice de peroxyde prévu (en meq O ₂ /kg)	Poids de la prise d'essai (en g)
de 0 à 12	de 5,0 à 2,0
de 12 à 20	de 2,0 à 1,2
de 20 à 30	de 1,2 à 0,8
de 30 à 50	de 0,8 à 0,5
de 50 à 90	de 0,5 à 0,3

Déboucher une fiole (5.2) et introduire la cuiller en verre contenant la prise d'essai. Ajouter 10 millilitres de chloroforme (6.1). Dissoudre rapidement la prise d'essai en agitant. Ajouter 15 millilitres d'acide acétique (6.2) puis 1 millilitre de solution d'iodure de potassium (6.3). Remettre le bouchon rapidement, agiter pendant une minute et laisser reposer pendant exactement 5 minutes à l'abri de la lumière et à une température de 15 à 25 °C.

Ajouter environ 75 millilitres d'eau distillée. Titrer l'iode libéré avec la solution de thiosulfate de sodium (6.4) (solution 0,002 N, si les indices prévus sont inférieurs à 12, et 0,001 N, s'ils sont supérieurs à 12) en agitant vigoureusement et en employant la solution d'amidon (6.5) comme indicateur.

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon.

Effectuer simultanément un essai à blanc. Si le résultat de ce dernier excède 0,05 millilitre de solution de thiosulfate de sodium (6.4) 0,001 N, remplacer les réactifs impurs.

9. EXPRESSION DES RÉSULTATS

L'indice de peroxyde (IP), exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme, est fourni par la formule:

$$IP = \frac{V \times T \times 1\,000}{m}$$

où:

V: = nombre de millilitres de solution de thiosulfate de sodium normalisée (6.4) utilisé pour l'essai, corrigé en fonction des résultats de l'essai à blanc;

T: = facteur de normalité exact de la solution de thiosulfate de sodium (6.4) utilisée;

m: = poids (en grammes) de la prise d'essai.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations.



ANNEXE IV

DÉTERMINATION DU CONTENU EN ALCOOLS ALIPHATIQUES AU MOYEN DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE AVEC COLONNE CAPILLAIRE

1. OBJET

La méthode décrit un procédé de détermination du contenu en alcools aliphatiques, simples et totaux, des matières grasses.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La matière grasse, additionnée de 1-icosanol comme standard interne, est saponifiée avec de l'hydroxyde de potassium en solution dans l'éthanol, puis l'insaponifiable est extrait avec de l'éther éthylique. La fraction des alcools est séparée de l'extrait insaponifiable par chromatographie sur plaque de gel de silice basique; les alcools récupérés dans le gel de silice sont transformés en triméthylsilyléthers et analysés par chromatographie en phase gazeuse en colonne capillaire.

3. APPAREILLAGE

- 3.1. Ballon de 250 millilitres muni d'un réfrigérant à reflux avec embouts rodés.
- 3.2. Ampoule à décanter de 500 millilitres.
- 3.3. Ballons de 250 millilitres.
- 3.4. Équipement complet pour chromatographie en phase solide, avec plaques de verre de 20 × 20 centimètres.
- 3.5. Lampe à lumière ultraviolette, de longueur d'onde de 366 ou 254 nm.
- 3.6. Microseringues de 100 et 500 microlitres.
- 3.7. Ampoule cylindrique filtrante à filtre poreux G 3 (porosité 15 à 40 micromètres) de 2 centimètres de diamètre environ et de 5 centimètres de hauteur, avec embout approprié pour filtration sous vide et embout rodé mâle 12/21.
- 3.8. Fiole à vide de 50 millilitres avec embout rodé femelle 12/21 adaptable à l'ampoule filtrante (3.7).
- 3.9. Tube à fond conique, de 10 millilitres, avec bouchon hermétique.
- 3.10. Chromatographe en phase gazeuse approprié au fonctionnement avec colonne capillaire, équipé d'un système de fractionnement, constitué de:
 - 3.10.1. Enceinte thermostatée pour la colonne, permettant de maintenir la température désirée avec une précision d'environ 1° C
 - 3.10.2. Ensemble de vaporisation thermoréglable avec élément vaporisateur en verre persilanisé
 - 3.10.3. Détecteur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur
 - 3.10.4. Enregistreur-intégrateur approprié au fonctionnement avec un convertisseur-amplificateur avec un temps de réponse non supérieur à 1 seconde et avec une vitesse de papier variable.
- 3.11. Colonne capillaire en verre ou en silice fondue, de 20 à 30 mètres de long, de 0,25 à 0,32 millimètre de diamètre intérieur, recouverte intérieurement de liquide SE-52 ou SE-54 ou équivalent, avec une épaisseur comprise entre 0,10 et 0,30 micromètre.
- 3.12. Microseringue pour chromatographie en phase gazeuse de 10 microlitres avec aiguille cémentée.

4. RÉACTIFS

- 4.1. Hydroxyde de potassium, solution éthanolique à environ 2N: dissoudre, tout en refroidissant, 130 grammes d'hydroxyde de potassium (titre minimum 85 %) dans 200 millilitres d'eau distillée, puis compléter à un litre avec de l'éthanol. La solution se conserve dans des bouteilles de verre opaque bien bouchées.
- 4.2. Éther éthylique, pour analyses.
- 4.3. Sulfate de sodium anhydre pur, pour analyses.

▼**B**

- 4.4. Plaques de verre recouvertes de gel de silice sans indicateur de fluorescence, de 0,25 millimètre d'épaisseur (elles sont disponibles dans le commerce déjà prêtes à l'emploi).
- 4.5. Hydroxyde de potassium, solution éthanolique à 0,2 N: dissoudre 13 grammes d'hydroxyde de potassium dans 20 millilitres d'eau distillée, puis compléter à un litre avec de l'éthanol.
- 4.6. Benzène, pour chromatographie (5.2.2).
- 4.7. Acétone, pour chromatographie (5.2.2).
- 4.8. Hexane pour chromatographie (5.2.2).
- 4.9. Éther éthylique, pour chromatographie (5.2.2).
- 4.10. Chloroforme pur, pour analyse.
- 4.11. Solution de refroidissement pour la chromatographie sur plaque: cholestérol ou phytostérol, solution à 0,5 % dans le chloroforme.
- 4.12. Dichloro-2' -7' fluorescéine, solution éthanolique à 0,2 %. Elle est rendue légèrement basique par addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique 2N d'hydroxyde de potassium.
- 4.13. Pyridine anhydre, pour chromatographie.
- 4.14. Hexaméthylidisilazane.
- 4.15. Triméthylchlorosilane.
- 4.16. Solution échantillon des triméthylsilyléthers des alcools aliphatiques de C₂₀ à C₂₈. À préparer au moment de l'emploi des mélanges d'alcools purs.
- 4.17. 1-eicosanol, solution à 0,2 % (m/V) dans le chloroforme (standard interne).
- 4.18. Gaz vecteur: hydrogène ou hélium pur, pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.19. Gaz auxiliaire: hydrogène ou hélium pur, pour chromatographie en phase gazeuse.
5. PROCÉDÉ
- 5.1. Préparation de l'insaponifiable
- 5.1.1. Introduire dans le ballon de 250 millilitres, au moyen de la microseringue de 500 microlitres, un volume de solution d'1-eicosanol à 0,1 % dans le chloroforme (4.17) qui contient une quantité d'1-eicosanol qui corresponde à environ 10 % du contenu en alcools aliphatiques dans l'aliquote de l'échantillon à prélever pour la détermination. Par exemple, pour 5 grammes d'échantillon, il faut ajouter 250 microlitres de la solution d'1-eicosanol à 0,1 % s'il s'agit d'un échantillon d'huile d'olive ►**M6** — et 1 500 microlitres s'il s'agit d'huile de grignons d'olive.

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

- 5.1.2. Ajouter 50 millilitres de solution éthanolique d' ►**C1** hydroxyde de potassium 2 N ◀, mettre en marche le réfrigérant à reflux, chauffer au bain-marie jusqu'à légère ébullition tout en maintenant une agitation énergique jusqu'à ce que la saponification se soit produite (la solution devient limpide). Continuer à réchauffer pendant 20 minutes, puis ajouter 50 millilitres d'eau distillée que l'on fait descendre du haut du réfrigérant, débrancher le réfrigérant et refroidir le ballon à environ 30° C.
- 5.1.3. Transvaser le contenu du ballon, de façon quantitative, dans une ampoule à décanter de 500 millilitres, en s'aidant d'eau distillée à plusieurs reprises, en utilisant au total environ 50 millilitres. Ajouter environ 80 millilitres d'éther éthylique, agiter énergiquement durant environ 30 secondes et laisser la séparation se faire (note 1).

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

Note 1: Des éventuelles émulsions peuvent être éliminées en ajoutant, avec une pissette, une petite quantité d'alcool éthylique ou méthylique.

▼B

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

Éliminer l'eau de lavage, dessécher au sulfate de sodium anhydre et filtrer, sur sulfate de sodium anhydre, dans un ballon de 250 millilitres pesé au préalable, en lavant ampoule et filtre avec de petites quantités d'éther éthylique.

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

- 5.2. Séparation de la fraction alcoolique

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

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

Note 2: L'emploi des plaques de gel de silice basiques pour la séparation de la fraction alcoolique élimine le besoin du traitement de l'insaponifiable avec l'alumine. De cette manière, tous les composés de nature acide (acides gras et autres) sont retenus sur la ligne de dépôt. On obtient ainsi la bande des alcools aliphatiques et terpéniques nettement séparée de la bande des stérols.

- 5.2.2. ►**M6** Introduire dans la cuve de développement un mélange hexane-éther éthylique 65/35 (v/v) jusqu'à une hauteur d'environ 1 cm⁽¹⁾. ◀ Fermer le couvercle à l'aide d'un couvercle approprié et laisser ainsi pendant une demi-heure au moins, de façon à ce que l'équilibre liquide/vapeur s'établisse. Il est possible de fixer sur les surfaces intérieures de la cuve des bandes de papier filtre qui plongent dans l'éluant: cette précaution permet de réduire d'un tiers environ les temps de migration du front du liquide et d'obtenir une élution plus uniforme des composants.

Note 3: Afin d'avoir des conditions d'élution parfaitement reproductibles, le mélange doit être changé à chaque essai.

- 5.2.3. Préparer une solution à 5 % environ d'insaponifiable (5.1.5) dans le chloroforme et, avec la microsiringue de 100 microlitres, déposer sur la plaque chromatographique (5.2.1) à 2 centimètres environ d'un bord, 0,3 millilitre de la solution susdite en une ligne continue, la plus fine et uniforme possible. Dans l'alignement de la ligne de dépôt, déposer, à une des extrémités de la plaque, 2 à 3 microlitres de la solution de référence des alcools aliphatiques (4.11), dans le but d'identifier la bande des alcools aliphatiques lors du dernier développement.

- 5.2.4. Mettre la plaque dans la cuve de développement, préparée comme décrit au point 5.2.2. La température ambiante doit être maintenue entre 15 et 20° C. Fermer aussitôt la chambre avec le couvercle et laisser éluer jusqu'à ce que le front de solvant arrive à environ 1 centimètre du bord supérieur de la plaque. Enlever ensuite la plaque de la cuve de développement et faire évaporer le solvant dans un courant d'air chaud ou bien en laissant la plaque enfermée pendant un petit moment.

- 5.2.5. Vaporiser la plaque légèrement et uniformément avec la solution de dichloro-2' -7' fluorescéine. Identifier la bande des alcools aliphatiques par alignement avec la tache obtenue avec la solution de référence; délimiter la bande avec un crayon noir l'ensemble de la bande des alcools aliphatiques et de la bande immédiatement supérieure qui correspond aux alcools terpéniques.

Note 4: La précision faite de recueillir l'ensemble de la bande des alcools aliphatiques et de la bande des alcools terpéniques est due au fait que dans celle-ci, dans les conditions de la méthode, sont englobées des quantités significatives d'alcools aliphatiques.

⁽¹⁾ Dans ces cas particuliers, il faut employer le mélange éluant benzène-acétone 95/5 (v/v) pour obtenir une bonne séparation des bandes.

▼B

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

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

Le résidu contenu dans le tube est constitué de la fraction alcoolique.

- 5.3. Préparation des triméthylsilyléthers

- 5.3.1. Ajouter, dans le tube contenant la fraction alcoolique, le réactif de silylation, constitué d'un mélange de pyridine-hexaméthylsilylazane-triméthylchlorosilane 9/3/1 (V/V/V) (note 5) dans une proportion de 50 microlitres par milligramme d'alcools aliphatiques, en évitant toute absorption d'humidité (note 6).

Note 5: Il existe dans le commerce des solutions prêtes à l'emploi; en outre, d'autres réactifs silanisants, tels que, par exemple, le bis-triméthylsilyltrifluoracétamide + 1 % de triméthylchlorosilane à diluer par un même volume de pyridine anhydre.

- 5.3.2. Boucher le tube, agiter soigneusement (sans retourner) jusqu'à complète solubilisation des alcools aliphatiques. 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 6: La formation éventuelle d'une légère opalescence est normale et n'est la cause d'aucun dérangement. La formation d'une floculation blanche ou l'apparition d'une coloration rose sont l'indice de la présence d'humidité ou d'altération du réactif. Dans ce cas, l'essai doit être répété.

- 5.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse.

- 5.4.1. Opérations préliminaires, conditionnement de la colonne

- 5.4.1.1. Installer la colonne dans le chromatographe en phase gazeuse, en reliant l'extrémité d'entrée à l'évaporateur connecté au système de fractionnement et l'extrémité de sortie au détecteur.

Effectuer les contrôles généraux du complexe de chromatographie en phase gazeuse (étanchéité du circuit des gaz, efficacité du détecteur, efficacité du système de fractionnement et du système d'enregistrement, etc.).

- 5.4.1.2. Si la colonne est utilisée pour la première fois, il est conseillé de procéder à son conditionnement. Faire passer un léger flux de gaz au travers de cette colonne, puis allumer le complexe de chromatographie en phase gazeuse et commencer un chauffage graduel jusqu'à rejoindre une température d'au moins 20° C supérieure à celle d'exercice (note 7). Maintenir cette température pendant au moins 2 heures, puis porter le complexe aux conditions de fonctionnement (régulation du flux gazeux et de la séparation, allumage de la flamme, jonction avec l'enregistreur électronique, régulation de la température de la chambre pour la colonne, du détecteur et de l'initiateur 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 pic de quelque nature que ce soit et ne doit pas présenter de dérive.

Une dérive rectiligne négative indique une étanchéité imparfaite des connexions de la colonne, une dérive positive indique un conditionnement insuffisant de la colonne.

Note 7: La température de conditionnement doit être toujours inférieure d'au moins 20° C à la température maximale prévue pour le liquide de répartition employé.

- 5.4.2. Choix des conditions opératoires

▼B

5.4.2.1. Les conditions opératoires maximales sont les suivantes:

- température de la colonne: début isotherme 8 minutes à 180° C, puis programme de 5° C par minute jusqu'à 260° C puis encore 15 minutes à 260° C,
- température de l'évaporateur: 280° C,
- température du détecteur: 290° C,
- vitesse linéaire du gaz de transport: hélium, 20 à 35 centimètres par seconde; hydrogène, 30 à 50 centimètres par seconde,
- ►C1 rapport de division ◀: de 1/50 à 1/100,
- sensibilité instrumentale: de 4 à 16 fois l'atténuation minimale,
- sensibilité d'enregistrement: 1 à 2 millivolts sur échelle de fond,
- vitesse du papier: 30 à 60 centimètres par heure,
- quantité de substance injectée: 0,5 à 1 microlitre de solution de TMSE.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et du chromatographe en phase gazeuse de façon à obtenir des chromatogrammes qui satisfassent aux conditions suivantes:

- le temps de rétention de l'alcool en C₂₆ doit être de 18 ± 5 minutes,
- le pic de l'alcool en C₂₂ doit être 80 ± 20 % de l'échelle de fond et pour l'huile de semences 40 ± 20 % de l'échelle de fond.

5.4.2.2. Pour vérifier les conditions exigées ci-dessus, effectuer des injections répétées avec les échantillons de mélanges des TMSE des alcools et retoucher les conditions opératoires jusqu'à obtenir les meilleurs résultats.

5.4.2.3. Les paramètres d'intégration des pics doivent être imposés de façon à obtenir des valeurs correctes pour les pics qui sont pris en considération.

5.4.3. Exécution de l'analyse

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

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

La ligne de base doit toujours correspondre aux conditions requises (5.4.1.2).

5.4.4. Identification des pics

L'identification des pics uniques est effectuée sur la base des temps de rétention et par comparaison avec le mélange des TMSE des alcools aliphatiques, analysés dans les mêmes conditions.

La figure 1 montre un chromatogramme de la fraction alcoolique d'une huile d'olive vierge.

5.4.5. Évaluation quantitative

5.4.5.1. Procéder, avec l'intégrateur, au calcul de l'aire des pics de l'1-eicosanol et des alcools aliphatiques de C₂₂ à C₂₈.

5.4.5.2. Calculer le contenu en chaque alcool aliphatique simple, en milligrammes par ►M6 1 000 ◀ grammes de matière grasse, comme suit:

$$\text{alcool } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot \text{►M6 1 000 ◀}}{A_s \cdot m}$$

où:

A_x = aire du pic de l'alcools x ►M6 ————— ◀;

A_s = aire du pic d'1-eicosanol ►M6 ————— ◀;

m_s = poids d'1-eicosanol ajouté, en milligrammes;

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

▼B

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Rapporter les contenus en alcools aliphatiques simples en milligrammes par ►M6 ►C2 1 000 ◀ ◀ grammes de matière grasse et leur somme comme «alcools aliphatiques totaux».

▼B

APPENDICE

Détermination de la vitesse linéaire du gaz

Dans le chromatographe en phase gazeuse, réglé aux conditions opératoires normales, injecter 1 à 3 microlitres 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 centimètres par seconde est donnée par L/tM , où L est la longueur de la colonne en centimètres et tM le temps chronométré en secondes.

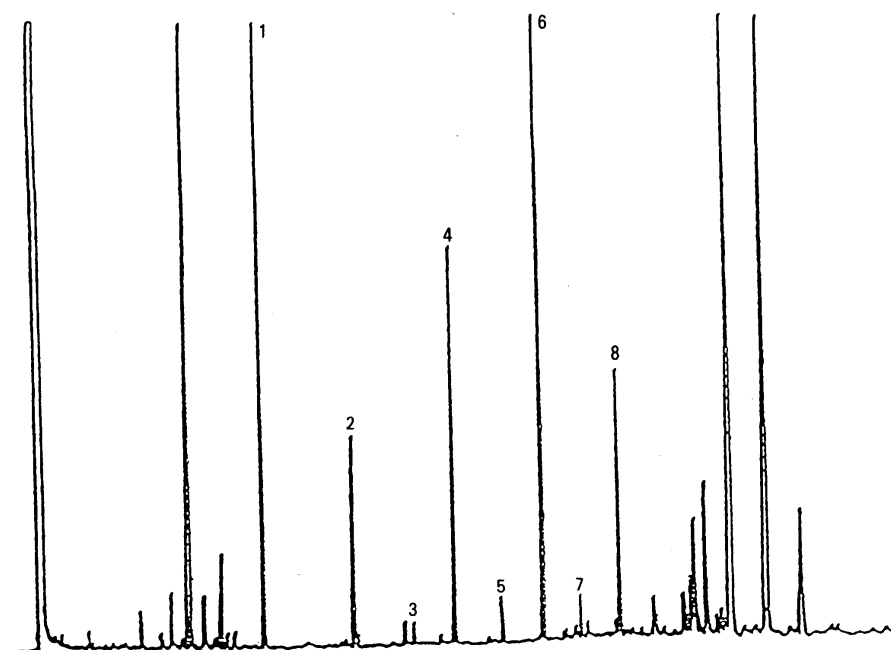
▼M6
▼C2

Figure 1 — Chromatogramme de la fraction alcoolique d'une huile vierge

- | | |
|------------------|------------------|
| 1 = Eicosanol | 5 = Pentacosanol |
| 2 = Docosanol | 6 = Hexacosanol |
| 3 = Tricosanol | 7 = Heptacosanol |
| 4 = Tétracosanol | 8 = Octacosanol |

▼B

ANNEXE V

DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION ET DU CONTENU EN STÉROLS AU MOYEN DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE AVEC COLONNE CAPILLAIRE

1. OBJET

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

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

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

3. APPAREILLAGE

3.1. Ballon de 250 millilitres muni d'un réfrigérant à reflux avec embouts rodés.

3.2. ►C1 Ampoules ◀ à décanter de 500 millilitres.

3.3. Ballons de 250 millilitres.

3.4. Équipement complet pour chromatographie en phase solide, avec plaques de verre de 20 × 20 centimètres.

3.5. Lampe à lumière ultraviolette, de longueur d'onde de 366 ou 254 nm.

3.6. Microseringues de 100 et 500 microlitres.

3.7. Ampoule cylindrique filtrante à filtre poreux G 3 (porosité 15 à 40 micromètres) de 2 centimètres de diamètre environ et de 5 centimètres de hauteur, avec embout approprié pour filtration sous vide et embout rodé mâle 12/21.

3.8. Fiole à vide 50 millilitres avec embout rodé femelle 12/21 adaptable à l'ampoule filtrante (3.7).

3.9. Tube à fond conique, de 10 millilitres, avec bouchon hermétique.

3.10. Chromatographe en phase gazeuse approprié au fonctionnement avec colonne capillaire, doté d'un système de séparation, constitué de:

3.10.1. Enceinte thermostatée pour la colonne, permettant de maintenir la température désirée avec une précision d'environ 1° C

3.10.2. Ensemble de vaporisation thermoréglable avec élément vaporisateur en verre persilanisé

3.10.3. Détecteur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur

3.10.4. Enregistreur-intégrateur approprié au fonctionnement avec un convertisseur-amplificateur.

3.11. Colonne capillaire en verre ou en silice fondue, de 20 à 30 mètres de long, de 0,25 à 0,32 millimètres de diamètre intérieur, recouverte intérioriquement de liquide. SE-52 ou SE-54 ou équivalent, avec une épaisseur comprise entre 0,10 et 0,30 micromètre.

3.12. Microseringue pour chromatographie en phase gazeuse de 10 ►C1 microlitres ◀ avec aiguille cémentée.

4. RÉACTIFS

4.1. Hydroxyde de potassium, solution éthanolique à environ 2N: dissoudre, tout en refroidissant, 130 grammes d'hydroxyde de potassium (titre minimum 85 %) dans 200 millilitres d'eau distillée, puis compléter à un litre avec de l'éthanol. La solution se conserve dans des bouteilles de verre opaque bien bouchées (éthanol 95 % V/V).

4.2. Éther éthylique pur, pour analyses.

4.3. Sulfate de sodium anhydre pur, pour analyses.

▼**B**

- 4.4. Plaques de verre recouvertes de gel de silice sans indicateur de fluorescence, de 0,25 millimètre d'épaisseur (elles sont disponibles dans le commerce déjà prêtes à l'emploi).
- 4.5. Hydroxyde de potassium, solution éthanolique à 0,2N: dissoudre 13 grammes d'hydroxyde de potassium dans 20 millilitres d'eau distillée, puis compléter à un litre avec de l'éthanol.
- 4.6. Benzène, pour chromatographie (5.2.2).
- 4.7. Acétone, pour chromatographie (5.2.2).
- 4.8. Hexane pour chromatographie (5.2.2).
- 4.9. Éther éthylique, pour chromatographie (5.2.2).
- 4.10. Chloroforme pur, pour analyses.
- 4.11. ►**C1** Solution de référence ◀ pour la chromatographie sur plaque: cholestérol ou phytostérol, solution à ►**M6** 2 % ◀ dans le chloroforme.
- 4.12. Dichloro-2' -7' fluorescéine, solution éthanolique à 0,2 %. Elle est rendue légèrement basique par addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique 2N d'hydroxyde de potassium.
- 4.13. Pyridine anhydre, pour chromatographie.
- 4.14. Hexaméthylsilazane.
- 4.15. Triméthylchlorosilane.
- 4.16. Solution échantillon des triméthylsilyléthers des stérols: à préparer au moment de l'emploi à partir des stérols tirés des huiles qui les contiennent.
- 4.17. α -cholestanol, solution à 0,2 % (m/V) dans le chloroforme (standard interne).
- 4.18. Gaz vecteur: hydrogène ou hélium pur, pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.19. Gaz auxiliaire: hydrogène ou hélium pur, pour chromatographie en phase gazeuse.

5. PROCÉDÉ

- 5.1. Préparation de l'insaponifiable
 - 5.1.1. Introduire dans le ballon de 250 millilitres, au moyen de la microseringue de 500 microlitres, un volume de solution d' α -cholestanol à 0,2 % dans le chloroforme (4.17) qui contienne une quantité d' α -cholestanol correspondant à environ 10 % des stérols contenus dans l'aliquote d'échantillon à prélever pour la détermination. Par exemple, pour 5 grammes d'échantillon, il faut ajouter 500 microgrammes de la solution d' α -cholestane à 0,2 % s'il s'agit d'un échantillon d'huile d'olive et 1 500 microlitres s'il s'agit ►**M6** ————— ◀ d'huile de grignons d'olive.

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

Dans le cas d'huiles ►**M6** ————— ◀ qui contiennent des quantités considérables de cholestérol, un pic ayant un temps de rétention identique à celui du cholestanol peut être présent. Dans de tels cas, il faut analyser la fraction stérolique en double, avec et sans standard interne ►**M6** ou utiliser, au lieu de cholestérol, le betulinol ◀.

- 5.1.2. Ajouter 50 millilitres de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 2N, mettre en marche le réfrigérant à reflux, chauffer au bain-marie jusqu'à légère ébullition tout en maintenant une agitation énergique jusqu'à ce que la saponification se soit produite (la solution devient limpide). Continuer à réchauffer pendant 20 minutes, puis ajouter 50 millilitres d'eau distillée que l'on fait descendre du haut du réfrigérant, débrancher le réfrigérant et refroidir le ballon à environ 30° C.
- 5.1.3. Transvaser le contenu du ballon de façon quantitative, dans une ampoule à décanter de 500 millilitres, en s'aidant d'eau distillée à plusieurs reprises, en utilisant au total environ 50 millilitres. Ajouter environ 80 millilitres d'éther éthylique, agiter énergiquement durant environ 30 secondes et laisser la séparation se faire (note 1).

Séparer la phase aqueuse inférieure en la recueillant dans une autre ampoule à décanter. Faire encore deux extractions sur la phase aqueuse,

▼B

selon les mêmes modalités en utilisant à chaque fois 60 à 70 millilitres d'éther éthylique.

Note 1: Des éventuelles émulsions peuvent être éliminées en ajoutant, avec une pissette, une petite quantité d'alcool éthylique ou méthylique.

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

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

- 5.1.5. Distiller l'éther jusqu'à ce qu'il en reste de petites quantités, puis porter à sec sous un léger vide ou dans un courant d'azote, parfaire le séchage à l'étuve à 100° C durant un quart d'heure environ et peser après refroidissement dans un dessiccateur.
- 5.2. Séparation de la fraction stérolique.

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

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

Note 2: L'emploi des plaques de gel de silice basiques pour la séparation de la fraction stérolique élimine le besoin du traitement de l'insaponifiable avec l'alumine. De cette manière, tous les composés de nature acide (acides gras et autres) sont retenus sur la ligne de dépôt. On obtient ainsi la bande des stérols nettement séparée de la bande des alcools aliphatiques et terpéniques.

- 5.2.2. Introduire dans la cuve de développement un mélange benzène-acétone 95/5 (V/V) jusqu'à une hauteur d'environ 1 centimètre. On peut utiliser à la place un mélange hexane-éther éthylique 55/35 (V/V). Fermer la cuve à l'aide d'une couvercle approprié et laisser ainsi pendant une demi-heure au moins, de façon à ce que l'équilibre liquide/vapeur s'établisse. Il est possible de fixer sur les surfaces intérieures de la cuve des bandes de papier filtré qui plongent dans l'éluant: cette précaution permet de réduire d'un tiers environ le temps de migration du front du liquide et d'obtenir une élution plus uniforme des composants.

Note 3: Afin d'avoir des conditions d'élution parfaitement reproductibles, le mélange doit être chargé à chaque essai.

- 5.2.3. Préparer une solution à 5 % environ d'insaponifiable (5.1.5) dans le chloroforme et, avec la microsiringue de ►C1 100 microlitres ◄, déposer sur la plaque chromatographique (5.2.1), à 2 centimètres environ d'un bord, 0,3 millilitre de la solution susdite en une ligne continue, la plus fine et uniforme possible. Dans l'alignement de la ligne de dépôt, déposer, à une des extrémités de la plaque, 2 à 3 microlitres de la solution de référence des stérols (4.11), dans le but d'identifier la bande des stérols lors du dernier développement.
- 5.2.4. Mettre la plaque dans la cuve de développement, préparée comme décrit en (5.2.2). La température ambiante doit être maintenue entre 15 et 20° C. Fermer aussitôt la chambre avec le couvercle et laisser éluer jusqu'à ce que le front de solvant arrive à environ 1 centimètre du bord supérieur de la plaque. Enlever ensuite la plaque de la cuve de développement et faire évaporer le solvant dans un courant d'air chaud ou bien en laissant la plaque sous hotte pendant un petit moment.
- 5.2.5. Vaporiser légèrement la plaque et de façon uniforme avec la solution de dichloro-2₂-7₂ fluorescéine. Identifier la bande des stérols par alignement avec la tache obtenue avec la solution de référence; délimiter la bande avec un crayon noir le long des bords de la fluorescence.
- 5.2.6. Racler avec une spatule métallique le gel de silice compris dans la zone délimitée. Le matériau retiré, finement broyé, est introduit dans l'ampoule filtrante (3.7); ajouter 10 millilitres de chloroforme chaud, mélanger soigneusement avec la spatule métallique et filtrer à l'aide du vide, puis recueillir le filtrat dans la fiole (3.8) reliée à l'ampoule filtrante.

▼B

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

Le résidu contenu dans le tube est constitué de la fraction stérolique.

5.3. Préparation des triméthylsilyléthers

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

Note 4: Il existe dans le commerce des solutions prêtes à l'emploi; en outre, d'autres réactifs silanisants, tels que, par exemple, le bis-triméthylsilyltrifluoracétamide + 1 % de triméthylchlorosilane à diluer par un même volume de pyridine anhydre.

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

Note 5: La formation éventuelle d'une légère opalescence est normale et n'est la cause d'aucun dérangement. La formation d'une floculation blanche ou l'apparition d'une coloration rose sont l'indice de la présence d'humidité ou de l'altération du réactif. Dans ce cas, l'essai doit être répété.

5.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

5.4.1. Opérations préliminaires, conditionnement de la colonne

- 5.4.1.1. Installer la colonne dans le chromatographe en phase gazeuse, en reliant l'extrémité d'entrée à l'évaporateur connecté au système de séparation et l'extrémité de sortie au détecteur.

Effectuer les contrôles généraux du complexe de chromatographie en phase gazeuse (étanchéité du circuit des gaz, efficacité du détecteur, efficacité du système de séparation et du système d'enregistrement, etc.).

- 5.4.1.2. Si la colonne est utilisée pour la première fois, il est conseillé de procéder à son conditionnement. Faire passer un léger flux de gaz au travers de cette colonne, puis allumer le complexe de chromatographie en phase gazeuse et commencer un chauffage graduel jusqu'à rejoindre une température d'au moins 20° C supérieure à celle d'exercice (note 6). Maintenir cette température pendant au moins deux heures, puis porter le complexe aux conditions de fonctionnement (régulation du flux gazeux et du fractionnement, allumage de la flamme, jonction avec l'enregistreur électronique, régulation de la température de la chambre pour la colonne du détecteur et de l'initiateur, etc.) et enregistrer le signal à une sensibilité d'au moins deux fois supérieure à celle prévue pour l'exécution de l'analyse. Le tracé de la ligne de base obtenue doit être linéaire, exempt de pic de quelque nature que ce soit et ne doit pas présenter de dérive.

Une dérive rectiligne négative indique une étanchéité imparfaite des connexions de la colonne, une dérive positive indique un conditionnement insuffisant de la colonne.

Note 6: La température de conditionnement doit être toujours inférieure d'au moins 20° C à la température maximale prévue pour le liquide de répartition employé.

5.4.2. Choix des conditions opératoires

- 5.4.2.1. Les conditions opératoires maximales sont les suivantes:

- température de la colonne: 260° C ± 5° C,
- température de l'évaporateur: 280° C,
- température du détecteur: 290° C,
- vitesse linéaire du gaz de transport: hélium, 20 à 35 centimètres par seconde; hydrogène, 30 à 50 centimètres par seconde,
- ►C1 rapport de division ◀: de 1/50 à 1/100,

▼B

- sensibilité instrumentale: de 4 à 16 fois l'atténuation minimale,
- sensibilité d'enregistrement: 1 à 2 millivolts sur échelle de fond,
- vitesse du papier: 30 à 60 centimètres par heure,
- quantité de substance injectée: 0,5 à 1 microlitre de solution de TMSE.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et du chromatographe en phase gazeuse de façon à obtenir des chromatogrammes qui satisfassent aux conditions suivantes:

- le temps de rétention du β -sitostérol doit être de 20 ± 5 minutes,
- le pic de campestérol doit être: pour l'huile d'olive (contenu moyen 3 %) 15 ± 5 % de l'échelle de fond, pour l'huile de soja (contenu moyen 20 %) 80 ± 10 % de l'échelle de fond,
- il doit y avoir séparation de tous les stérols présents; il est nécessaire que les autres pics séparés soient aussi complètement résolus, ce qui veut 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, qu'elle soit quantifiable selon la perpendiculaire au pic à TRR 1,02.

5.4.3. Exécution de l'analyse

5.4.3.1. Prélever, avec la microseringue de 10 microlitres, 1 microlitre d'hexane, aspirer 0,5 microlitre d'air et successivement 0,5 et 1 microlitre de la solution de l'échantillon; tirer encore le piston de la seringue de façon à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille au travers de la membrane du complexe d'injection et, après 1 à 2 secondes, injecter rapidement et extraire ensuite l'aiguille lentement, après 5 secondes environ.

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

La ligne de base doit toujours correspondre aux qualités requises (5.4.1.2).

5.4.4. Identification des pics

L'identification des pics uniques est effectuée sur la base des temps de rétention et par comparaison avec le mélange des TMSE des stérols, analysés dans les mêmes conditions.

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

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

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

5.4.5. Évaluation quantitative

5.4.5.1. Procéder, avec l'intégrateur, au calcul de l'aire des pics de l' α -cholestanol et des stérols. Ne pas considérer les pics éventuels de compositions non comprises dans celles énumérées dans le tableau 1. Le coefficient de réponse GLC de l' α -cholestanol s'entend égal à 1.

5.4.5.2. Calculer le contenu en chaque stérol simple, en milligrammes par 100 grammes de matière grasse, comme suit:

$$\text{stérol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m}$$

où:

A_x = aire du pic du stérol x ► **M6** ————— ◀;

A_s = aire du pic d' α -cholestanol ► **M6** ————— ◀;

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

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

▼B

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

- 6.1. Rapporter les contenus de chaque stérol en milligrammes par 100 grammes de matière grasse et leur somme comme «stérols totaux».
- 6.2. On calcule le pourcentage de chaque stérol à partir du rapport entre l'aire du pic correspondant et la somme des aires des pics des stérols.

$$\% \text{ du stérol } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

A_x = aire du pic x.

ΣA = somme des aires de tous les pics.

▼B

APPENDICE

Détermination de la vitesse linéaire du gaz

Dans le chromatographe en phase gazeuse, réglé aux conditions opératoires normales, injecter 1 à 3 microlitres 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 centimètres par seconde est donnée par L/tM, où L est la longueur de la colonne en centimètres et tM le temps chronométré en secondes.

Tableau I

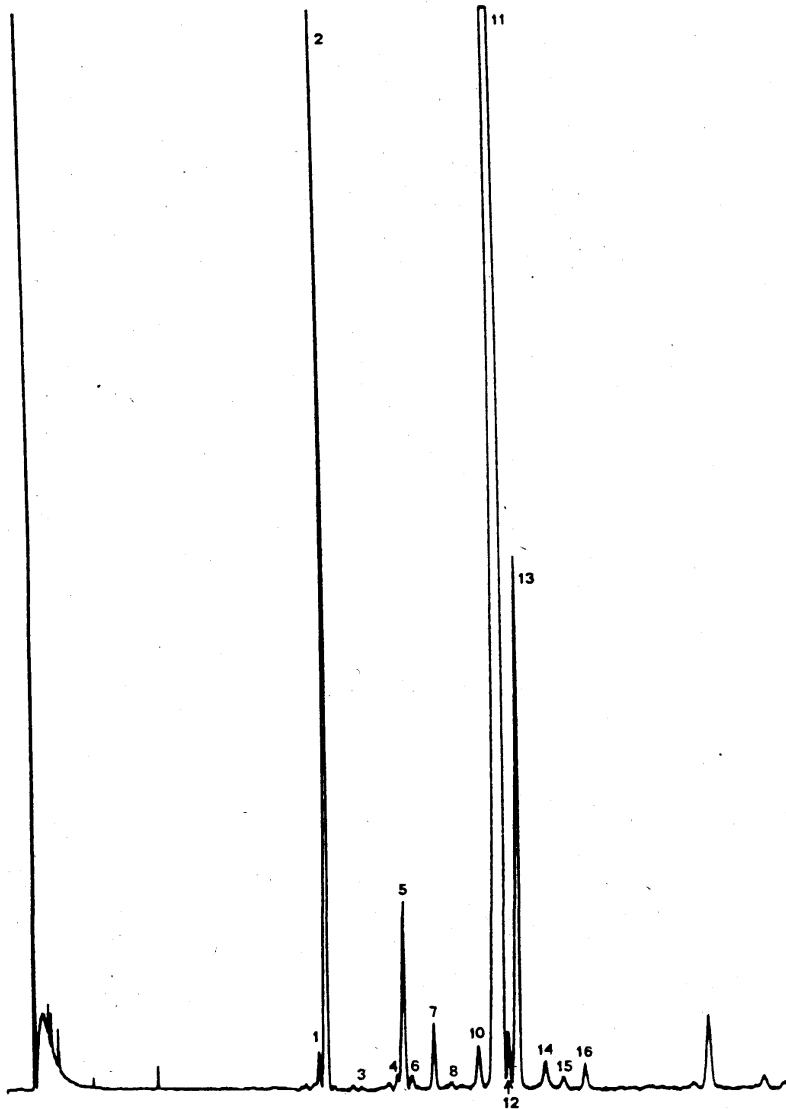
Temps de rétention relatifs des stérols

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 -cholestane	0,68	0,64
3	brassicastérol	[24S]-24-méthyl- Δ -5,22-cholestadiène-3 β -ol	0,73	0,71
4	24-méthylène-cholestérol	24-méthylén- Δ -5,24-cholestadiène-3 β -ol	0,82	0,80
5	campestérol	[24R]-24-méthyl- Δ -5-cholestène-3 β -ol	0,83	0,81
6	campestanol	[24R]-24-méthyl-cholestane-3 β -ol	0,85	0,82
7	stigmastérol	[24S]-24-éthyl- Δ -5,22-cholestadiène-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-campestérol	[24R]-24-méthyl- Δ -7-cholestène-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadiénol	[24S,R]-24-éthyl- Δ -5,23-cholestadiène-3 β -ol	0,95	0,95
10	chlérostérol	[24S]-24-éthyl- Δ -5,25- ► C1 cholestadiène ◀ -3 β -ol	0,96	0,96
11	β -sitostérol	[24R]-24-éthyl- Δ -5-cholestène-3 β -ol	1,00	1,00
12	sitostanol	24-éthyl-cholestane-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-avénastérol	[24Z]-24-éthyliden-5-cholestène-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5,24-stigmastadiénol	[24S,R]-24-éthyl- Δ -5,24-cholestadiène-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastérol	[24S,R]-24-éthyl- ► C1 Δ -7-cholestène ◀ -3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avénestérol	[24Z]-24-éthyliden- Δ -7-cholestène-3 β -ol	1,16	1,16

▼B

Figure 1

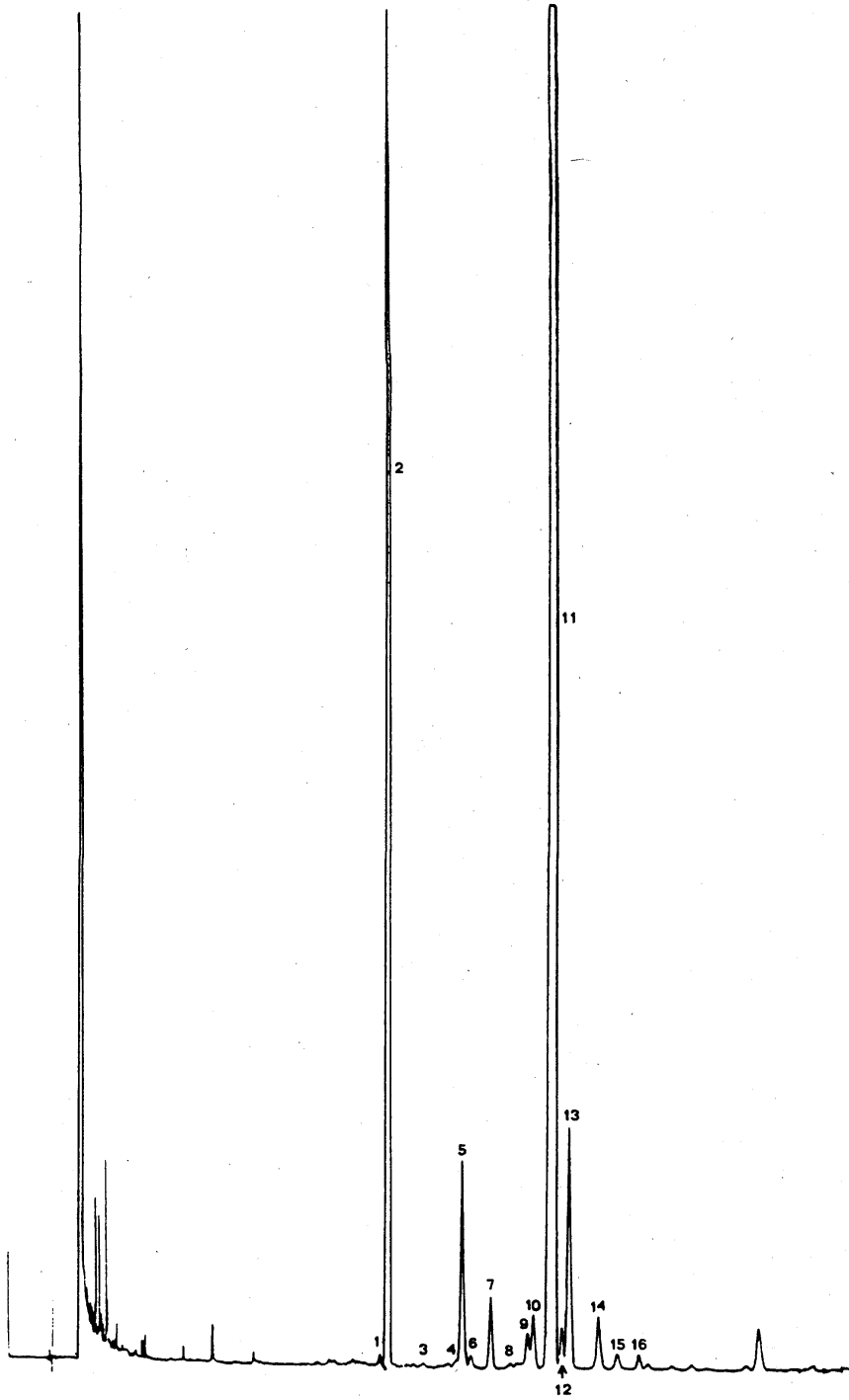
Chromatographie en phase gazeuse de la fraction stérolique d'une huile d'olive brute



▼B

Figure 2

Chromatographie en phase gazeuse de la fraction stérolique d'une huile d'olive raffinée





ANNEXE VI

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN ÉRYTHRODIOL ET EN UVAOL

AVANT-PROPOS

L'érythrodiol (terme générique qui désigne conventionnellement l'ensemble des diols érythrodiol et uvaol) est un élément constitutif de l'insaponifiable que l'on trouve dans certains types de matières grasses. Son dosage peut servir à vérifier la présence d'huile d'olive d'extraction, sa concentration y étant nettement plus élevée que dans d'autres huiles (huiles d'olive de pression, huiles de pépins de raisin).

1. OBJET

La méthode décrit le procédé de détermination de la teneur en érythrodiol des matières grasses.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La matière grasse est saponifiée avec de l'hydroxyde de potassium en solution dans de l'éthanol. L'insaponifiable est ensuite extrait avec de l'éther éthylique, purifié par passage sur une colonne d'alumine et fractionné par chromatographie en couche mince sur des plaques de gel de silice. Les bandes des fractions stérolique et érythrodiolique sont alors isolées.

Les stérols et l'érythrodiol récupérés sur la plaque sont transformés en triméthylsilyléthers et analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Le résultat est exprimé en pourcentage d'érythrodiol par rapport à l'ensemble érythrodiol + stérols.

3. APPAREILLAGE

- 3.1. Appareillage décrit à l'annexe V (détermination de la teneur en stérols).

4. RÉACTIFS

- 4.1. Réactifs énumérés à l'annexe V (détermination de la teneur en stérols).
4.2. Solution de référence d'érythrodiol à 0,5 % dans du chloroforme.

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. **Préparation de l'insaponifiable**

Procéder comme indiqué au paragraphe 5.1.2 de l'annexe V.

5.2. **Séparation de l'érythrodiol et des stérols**

- 5.2.1. Voir paragraphe 5.2.1 de la méthode de l'annexe V.
5.2.2. Voir paragraphe 5.2.2 de la même méthode.
5.2.3. Préparer une solution d'insaponifiable (à 5 %) dans le chloroforme.

Avec la microseringue de 0,1 millilitre, déposer sur une plaque chromatographique, à environ 1,5 centimètre du bord inférieur, 0,3 millilitre de la solution susmentionnée, en une ligne la plus fine et la plus uniforme possible. À une extrémité de la plaque, déposer, pour référence, quelques microlitres des solutions de cholestérol et d'érythrodiol.

- 5.2.4. Mettre la plaque dans la cuve de développement préparée comme indiquée au paragraphe 5.2.1. La température ambiante doit être d'environ 20° C. Fermer aussitôt avec le couvercle et éluer jusqu'à ce que le niveau du solvant arrive à environ 1 centimètre du bord supérieur de la plaque. Enlever ensuite la plaque de la cuve de développement et évaporer le solvant dans un courant d'air chaud.
5.2.5. Vaporiser uniformément la solution de dichloro-2' 7' fluorescéine sur la plaque. En examinant cette dernière à la lumière ultraviolette, identifier les bandes de stérols et de l'érythrodiol par alignement avec les éléments de référence, puis délimiter avec une pointe légèrement en dehors des bords de la fluorescence.

▼B

5.2.6. Avec une spatule métallique, racler le gel de silice compris dans les zones délimitées. Introduire le matériau retiré de la plaque dans une fiole de 50 millilitres. Ajouter 15 millilitres de chloroforme chaud, bien agiter et filtrer dans l'ampoule à filtre poreux en transférant le gel de silice sur le filtre même. Laver par trois fois au chloroforme chaud (environ 10 millilitres à chaque fois) et recueillir le filtrat dans un ballon de 100 millilitres. Évaporer jusqu'à obtention d'un volume de 4 à 5 millilitres, transvaser, dans un tube centrifugeur à fond conique de 10 millilitres préalablement pesé, porter à sec en chauffant légèrement dans un courant d'azote, et peser.

5.3. **Préparation des triméthylsilyléthers**

Procéder comme indiqué au paragraphe 5.3 de la méthode de l'annexe V.

5.4. **Analyse par chromatographie en phase gazeuse**

Procéder comme indiqué au paragraphe 5.4 de la même méthode.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse doit être réalisée dans des conditions permettant le respect des exigences de l'analyse des stérols et la séparation des TMSE de l'érythrodiol et de l'uvaol.

Après avoir injecté l'échantillon, laisser le papier se dérouler jusqu'à élution complète des stérols présents, de l'érythrodiol et de l'uvaol. Identifier ensuite les pics (les temps de rétention relatifs de l'érythrodiol et de l'uvaol, par rapport au β -sitostérol, sont respectivement de 1,4 et 1,55 environ).

Calculer ensuite les aires comme indiqué pour les stérols.

6. **EXPRESSION DES RÉSULTATS**

$$\text{Pourcentage de l'Érythrodiol} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \Sigma A_{\text{stérols}}} \times 100$$

où:

A_1 : aire du pic de l'érythrodiol ► **M6** ————— ◀;

A_2 : aire du pic de l'uvaol ► **M6** ————— ◀;

$\Sigma A_{\text{stérols}}$: somme des aires des stérols présents
► **M6** ————— ◀.

Indiquer le résultat avec une décimale.



ANNEXE VII

DÉTERMINATION DES ACIDES GRAS SATURÉS EN POSITION 2 DU TRIGLYCÉRIDE

1. OBJET

La présente norme décrit une méthode de détermination de la composition de la fraction des acides gras d'une huile ou d'une matière grasse estérifiée dans la position 2 (ou position interne) du glycérol.

2. CHAMP D'APPLICATION

La présente norme est applicable aux huiles et matières grasses dont le point de fusion se situe en deça de 45° C, en raison des caractéristiques de l'action de la lipase pancréatique.

Elle n'est pas applicable sans réserves aux huiles et matières grasses contenant des quantités importantes d'acides gras comportant un nombre d'atomes de carbone égal ou inférieur à douze (huile de coco et de palmiste, matière grasse butyrique), des acides gras hautement insaturés (comportant plus de quatre liaisons doubles) comportant un nombre d'atomes de carbone égal ou supérieur à vingt (huiles de poisson et d'animaux marins) ou des acides gras comprenant des groupes oxygénés autres que le groupe acide.

3. PRINCIPE

Neutralisation éventuelle d'huiles et de matières grasses dans un solvant. Purification par passage sur une colonne d'alumine. Hydrolyse partielle des triglycérides par la lipase pancréatique au cours d'un laps de temps déterminé. Séparation des monoglycérides formés par chromatographie en couche mince et méthanolyse de ces derniers. Analyse des esters méthyliques par chromatographie en phase gazeuse/liquide.

4. APPAREILLAGE

- 4.1. Ballon de 100 millilitres.
- 4.2. Ballon de 25 millilitres avec embout rodé.
- 4.3. Réfrigérant à air d'une longueur d'un mètre, adaptable à la fiole visée au point 4.2.
- 4.4. Fiole conique de 250 millilitres.
- 4.5. Bêcher de 50 millilitres.
- 4.6. Ampoule à décanter de 500 millilitres.
- 4.7. Colonne de verre pour chromatographie (diamètre intérieur: 13 millimètres; longueur: 400 millimètres) munie d'un disque en verre fritté et d'un robinet.
- 4.8. ► **C1** Tube à centrifuger ◀ de 10 millilitres avec bouchon en verre rodé.
- 4.9. Burette de 5 millilitres avec graduations de 0,05 millilitre.
- 4.10. Seringue hypodermique de 1 millilitre munie d'une aiguille fine.
- 4.11. Microseringue pour gouttes de 3 à 4 microlitres.
- 4.12. Épandeuse pour chromatographie en couche mince.
- 4.13. Plaques de verre pour chromatographie en couche mince (20 × 20 centimètres).
- 4.14. Cuve de développement en verre pour chromatographie en couche mince, avec couvercle en verre rodé, convenant pour les plaques de 20 × 20 centimètres.
- 4.15. Vaporisateur pour chromatographie en couche mince.
- 4.16. Étuve réglée à 103 ± 2° C.
- 4.17. Thermostat réglable entre 30 et 45° C, à 0,5° C près.
- 4.18. Évaporateur rotatif.
- 4.19. Agitateur électrique vibrant, permettant d'agiter vigoureusement le tube centrifugeur.

▼B

- 4.20. Lampe à rayons ultraviolets pour l'examen des plaques pour chromatographie en couche mince.

Pour le contrôle de l'activité de la lipase:

- 4.21. pH-mètre
4.22. Agitateur à spirale
4.23. Burette de 5 millilitres
4.24. Chronomètre.

Pour la préparation éventuelle de la lipase:

- 4.25. Agitateur de laboratoire convenant pour la dispersion et le mélange de matières hétérogènes.

5. RÉACTIFS

- 5.1. n-hexane ou, à défaut, éther de pétrole, (b.e. 30-50° C), de qualité chromatographique.
5.2. 2-propanol (ou éthanol), 95° C (V/V), qualité analytique.
5.3. 2-propanol (ou éthanol) en solution aqueuse 1/1.
5.4. Éther diéthylique exempt de peroxydes.
5.5. Acétone.
5.6. Acide formique à au moins 98 % (m/m).
5.7. Solvant de développement: mélange de n-hexane (5.1), d'éther diéthylique (5.4) et d'acide formique (5.6) selon les proportions 70/30/1 (V/V/V).
5.8. Alumine activée pour chromatographie, neutre, de degré d'activité Brockmann I.
5.9. Poudre de silice, avec liant, de qualité adéquate pour la chromatographie en couche mince.
5.10. Lipase pancréatique de qualité adéquate (notes 1 et 2).
5.11. ► **C1** Hydroxyde ◀ de sodium en solution aqueuse (120 grammes par litre).
5.12. Acide chlorhydrique en solution aqueuse (6 N).
5.13. Chlorure de calcium (CaCl₂) en solution aqueuse (220 grammes par litre).
5.14. Chololate de sodium (qualité enzymatique) en solution aqueuse (1 gramme par litre).
5.15. Solution tampon: solution aqueuse 1 M de tris-hydroxyméthylaminométhane amené à un pH de 8 par addition d'acide chlorhydrique (5.12) (contrôle au potentiomètre).
5.16. Phénolphtaléine en solution (10 grammes par litre) dans de l'éthanol à 95 % (V/V).
5.17. Dichloro-2' -7' -fluorescéine en solution (2 grammes par litre) dans de l'éthanol à 95 % (V/V), légèrement alcalinisé par l'addition d'une goutte de solution d'hydroxyde de sodium 1 N par 100 millilitres.

Pour le contrôle de l'activité de la lipase:

- 5.18. Huile neutralisée
5.19. Hydroxyde de sodium en solution aqueuse 0,1 N
5.20. Chololate de sodium (qualité enzymatique) en solution aqueuse (200 grammes par litre)
5.21. Gomme arabique en solution aqueuse (100 grammes par litre).

6. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Si l'échantillon possède un taux d'acidité, déterminé selon l'annexe II, inférieur à 3 %, purifier directement sur alumine comme indiqué au point 6.2.

▼B

Si l'échantillon possède un taux d'acidité, déterminé selon l'annexe II, supérieur à 3 %, neutraliser par alcaline en présence d'un solvant, comme indiqué au point 6.1, puis passer sur alumine comme indiqué au point 6.2.

6.1. *Neutralisation par alcaline en présence d'un solvant*

Dans une ampoule à décantation (4.6), introduire environ 10 grammes d'huile brute et ajouter 100 millilitres d'hexane (5.1), 50 millilitres de 2-propanol (5.2), quelques gouttes de solution de phénolphtaléine (5.16) et une quantité de solution d'hydroxyde de sodium (5.11) correspondant à la teneur en acides libres de l'huile, majorée de 0,3 %.

Agiter vigoureusement pendant une minute, ajouter 50 millilitres d'eau distillée, agiter de nouveau et laisser reposer.

Après séparation, éliminer la couche inférieure de savon. Éliminer également toutes les couches intermédiaires (mucilage, matières insolubles). Laver la solution d'hexane et d'huile neutralisée avec plusieurs doses de 25 à 30 millilitres de solution de 2-propanol (5.3) jusqu'à ce que la couleur rose de la phénolphtaléine disparaisse.

Éliminer la majeure partie de l'hexane par distillation sous vide dans l'évaporateur rotatif (4.18) et sécher l'huile à 30-40° C (toujours sous vide) à l'aide d'un courant d'azote pur, jusqu'à élimination de l'hexane.

6.2. *Purification par passage sur alumine*

Préparer une suspension de 15 grammes d'alumine activée (5.8) dans 50 millilitres d'hexane (5.1) et verser, tout en agitant, sur la colonne chromatographique (4.7).

Procéder au tassement de l'alumine et laisser tomber le niveau du solvant jusqu'à 1 ou 2 millimètres au dessus de l'absorbant. Verser soigneusement sur la colonne une solution de 5 grammes d'huile dans 25 millilitres d'hexane (5.1). Recueillir l'ensemble de l'effluent de la colonne dans un ballon (4.1).

7. PRÉPARATION DES PLAQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Nettoyer à fond les plaques de verre (4.13) avec de l'éthanol, de l'éther, du pétrole et de l'acétone pour éliminer toute trace de matière grasse.

Dans une fiole conique (4.4), introduire 30 grammes de poudre de silice (5.9). Ajouter 60 millilitres d'eau distillée. Boucher et agiter vigoureusement pendant une minute. Transférer immédiatement la suspension dans l'épandeur (4.12) et enduire les plaques propres d'une couche de 0,25 millimètre d'épaisseur.

Sécher les plaques pendant 15 minutes à l'air, puis pendant une heure dans l'étuve (4.16) à $103 \pm 2^\circ$ C.

Amener les plaques à température ambiante dans un dessiccateur avant l'emploi.

Des plaques préparées sont disponibles dans le commerce.

8. MODE OPÉRATOIRE

8.1. *Hydrolyse par la lipase pancréatique*

Peser environ 0,1 gramme de l'échantillon préparé dans le ►C1 tube à centrifuger ◀ (4.8). S'il s'agit d'une matière grasse solide, dissoudre dans 0,2 millilitre d'hexane en chauffant légèrement, si nécessaire.

Ajouter 20 millilitres de lipase (5.10) et 2 millilitres de solution tampon (5.15). Agiter convenablement mais prudemment puis ajouter 0,5 millilitre de solution de cholate de sodium (5.14) et 0,2 millilitre de solution de chlorure de calcium (5.13). Fermer le tube avec le bouchon rodé, agiter prudemment (éviter de mouiller le bouchon) et placer le tube immédiatement dans le thermostat (4.17) maintenu à $40 \pm 0,5^\circ$ C. Agiter à la main pendant exactement 1 minute. Retirer le tube du thermostat et agiter vigoureusement à l'aide d'un agitateur électrique (4.19) pendant exactement 2 minutes. Refroidir immédiatement à l'eau courante; ajouter 1 millilitre d'acide chlorhydrique (5.12) et 1 millilitre d'éther diéthylique (5.4). Boucher et agiter vigoureusement à l'aide de l'agitateur électrique. Laisser reposer et éliminer la couche organique à l'aide de la seringue (4.10), si nécessaire après centrifugation.

▼B

8.2. *Séparation des monoglycérides par chromatographie en couche mince*

Appliquer l'extrait sur la plaque chromatographique en une couche mince et uniforme la plus étroite possible, à l'aide de la microsiringue (4.11), à environ 1,5 centimètre de l'extrémité inférieure. Introduire la plaque dans la cuve de développement bien saturée (4.14) et développer à l'aide du solvant (5.7) à environ 20° C, jusqu'à environ 1 centimètre de l'extrémité supérieure de la plaque.

Sécher la plaque à l'air, à la température de la cuve, et y pulvériser la solution de dichloro-2' -7' fluorescéine (5.17). Délimiter la bande des monoglycérides (R_f d'environ 0,035) sous lumière ultraviolette (4.20).

8.3. *Analyse des monoglycérides par chromatographie en phase gazeuse/liquide*

Récupérer la bande obtenue au point 8.2 à l'aide d'une spatule (en évitant d'enlever les composants restés sur la ligne de base) et la recueillir dans le récipient de méthylation (4.2).

Traiter directement la silice recueillie comme indiqué au point 4.1 de l'annexe X «B», de manière à convertir les monoglycérides en esters méthyliques, puis examiner les esters par chromatographie en phase gazeuse comme indiqué à l'annexe X «A».

9. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Déterminer la composition de la fraction des acides gras en position 2 en exprimant le résultat avec une décimale (note 3).

10. NOTES

Note 1: Contrôle de l'activité de la lipase

Préparer une émulsion d'huile en agitant dans un agitateur adéquat un mélange composé de 165 millilitres de solution de gomme arabique (5.21) de 15 grammes de glace pilée et de 20 millilitres d'une huile neutralisée (5.18).

Dans un bécher (4.5), verser 10 millilitres de cette émulsion, puis 0,3 millilitre de solution de cholate de sodium (5.20) et 20 millilitres d'eau distillée. Placer le bécher dans un thermostat maintenu à $37 \pm 0,5$ °C (note 4). Introduire les électrodes d'un pH-mètre (4.21) et un agitateur à spirale (4.22). À l'aide d'une burette (4.23), ajouter la solution d'hydroxyde de sodium (5.19) goutte à goutte jusqu'à ce que le pH atteigne 8,5.

Ajouter une quantité suffisante de suspension aqueuse de lipase (voir ci-dessous). Dès que le pH-mètre indique un pH de 8,3, déclencher le chronomètre (4.24) et commencer à ajouter la solution d'hydroxyde de sodium (5.19) goutte à goutte à la vitesse nécessaire pour maintenir constant le pH de 8,3. Noter à chaque minute le volume de solution alcaline consommée.

Rapporter les observations sur un diagramme en indiquant en abscisse les temps et en ordonnée les millilitres de solution alcaline nécessaires pour maintenir le pH constant.

Le résultat obtenu être une ligne droite.

la suspension de lipase susmentionnée est une suspension à 1 pour 1 000 (m/m) dans l'eau. Pour chaque essai, il convient d'en utiliser une quantité suffisante pour que, environ 1 millilitre de solution alcaline, soit consommé en 4 à 5 minutes.

Normalement, une quantité de poudre de 1 à 5 milligrammes est nécessaire.

L'unité lipasique est définie comme la quantité d'enzymes que libèrent 10 microéquivalents d'acide par minute. L'activité A de la poudre utilisée, exprimée en unités lipasiques par milligramme, est calculée au moyen de la formule suivante:

$$A = \frac{V \times 10}{m}$$

V: le volume de solution d'hydroxyde de sodium (5.19) consommé par minute (calculé à partir du graphique).

m: masse de la prise d'essai de poudre, en milligrammes.

Note 2: Préparation de la lipase

▼B

Des lipases ayant un niveau d'activité satisfaisant sont disponibles dans le commerce mais peuvent également être préparées comme suit.

Refroidir 5 kilogrammes de pancréas de porc frais à 0 °C; éliminer la graisse solide et le tissu conjonctif présents, puis triturer dans un mélangeur jusqu'à obtention d'une pâte fluide. Agiter cette masse dans l'agitateur (4.25) avec 2,5 litres d'acétone anhydre pendant 4 à 6 heures, puis centrifuger. Procéder à trois autres extractions sur le résidu avec le même volume d'acétone, puis à deux extractions avec un mélange 1/1 (V/V) d'acétone et d'éther diéthylique, et à deux extractions avec de l'éther diéthylique.

Sécher le résidu sous vide pendant 48 heures pour obtenir une poudre stable, à conserver au réfrigérateur.

Note 3: Dans tous cas, il est conseillé de déterminer la composition des acides gras totaux d'un même échantillon, puisque la comparaison avec celle des acides en position 2 permettra d'interpréter les chiffres obtenus.

Note 4: La température d'hydrolyse est fixée à 37 °C, puisqu'une huile liquide est utilisée. Celle de l'échantillon est toutefois fixée à 40 °C, pour qu'il soit possible d'examiner les matières grasses dont le point de fusion peut atteindre 45 °C.



ANNEXE VIII

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN ►C1 TRILINOLÉINE ◀

1. OBJET

Détermination de la composition des triglycérides des huiles végétales liquides, en termes de nombre de carbones équivalent, par chromatographie en phase liquide à haute performance.

La présente norme décrit une méthode de séparation et de détermination de la quantité des triglycérides des huiles végétales en termes de masse moléculaire et de degré de non-saturation, pris comme fonctions du nombre de carbones équivalent (voir note 1).

2. CHAMP D'APPLICATION

La présente norme est applicable à toutes les huiles végétales contenant des triglycérides d'acides gras à longue chaîne et convient particulièrement pour détecter la présence de faibles quantités d'huiles semi-siccatives (riches en acide linoléique) dans les huiles végétales dont le principal acide gras insaturé est l'acide oléique (huile d'olive).

3. PRINCIPE

Séparation des triglycérides selon leur nombre de carbones équivalent, par chromatographie en phase liquide à haute performance (phase inverse) et interprétation des chromatogrammes.

4. APPAREILLAGE

- 4.1. Appareil de chromatographie en phase liquide à haute performance permettant un contrôle thermostatique de la température de la colonne.
- 4.2. Seringue pour injections de 10 microlitres.
- 4.3. Détecteur: réfractomètre différentiel capable de déterminer l'indice de réfraction à 10^{-4} près.
- 4.4. Colonne: tube en acier inoxydable d'une longueur de 250 millimètres et d'un diamètre intérieur de 4,5 millimètres, garni de particules de silice de 5 micromètres de diamètre contenant 22 à 23 % de carbone, sous forme d'octadécylsilane (note 2).
- 4.5. Enregistreur et/ou intégrateur.

5. RÉACTIFS

Les réactifs doivent être de pureté analytique et les solvants d'élu­tion dégazés (ils peuvent être recyclés à plusieurs reprises sans que cela ne se répercute sur les séparations).

- 5.1. Chloroforme.
- 5.2. Acétone.
- 5.3. Acétonitrile.
- 5.4. Solvant d'élu­tion: acétonitrile + acétone. (Les proportions doivent être ajustées en fonction de la séparation souhaitée; commencer avec un mélange 50/50).
- 5.5. Solvant de solubilisation: acétone ou mélange (1:1) d'acétone et de chloroforme.
- 5.6. Triglycérides de référence: triglycérides commerciaux tels que la tripalmitine, la trioléine, etc. (les temps de rétention doivent alors être repris dans le graphique selon le nombre de carbones équivalent), ou chromatogramme de référence obtenu grâce à de l'huile de soya (voir notes 3 et 4, et schémas 1 et 2).

6. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Préparer une solution à 5 % des échantillons à analyser en pesant ►C1 0,5 ± 0,001 grammes ◀ d'échantillon dans une fiole graduée de 10 millilitres et compléter jusqu'à 10 millilitres avec le solvant de solubilisation (5.5).

▼B

7. MODE OPÉRATOIRE

7.1. Monter le système chromatographique. Pomper le solvant d'éluion (5.4) à raison de 1,5 millilitre par ►C1 minute ◀ pour purger l'ensemble du système. Attendre jusqu'à obtention d'une ligne de base stable.

Injecter 10 microlitres de l'échantillon préparé comme indiqué au point 6.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Utiliser la méthode de normalisation interne, autrement dit supposer que la somme des pourcentages des aires des pics correspondant au divers triglycérides est égale à 100 %.

Calculer le pourcentage de chaque triglycéride avec une décimale, en utilisant la formule:

$$\text{Pourcentage du triglycéride} = \frac{\text{aire du pic}}{\text{somme des aires des pics}} \times 100$$

Note 1: Il est possible de déterminer l'ordre d'éluion en calculant le nombre de carbones équivalent, souvent défini par le rapport NCE = NC - 2n, où NC est le nombre d'atomes de carbone et n le nombre de liaisons doubles.

On peut affiner le calcul en tenant compte de l'origine des liaisons doubles.

Si n_o , n_i , et n_{in} représentent le nombre des liaisons doubles attribuable aux acides oléique, linoléique et linoléique, le nombre de carbones équivalent peut être calculé selon la formule:

$$\text{NCE} = \text{NC} - d_o n_o - d_i n_i - d_{in} n_{in},$$

où les coefficients d_o , d_i et d_{in} peuvent être calculés à l'aide des triglycérides de référence. Dans les conditions spécifiées dans la présente méthode, le résultat obtenu se rapproche de la formule:

$$\text{NCE} = \text{NC} - (2,60 n_o) - (2,35 n_i) - (2,17 n_{in}).$$

Note 2: Exemples: Lichrosorb (Merck) RP 18 Art 50333,

Lichrosphère (Merck) 100 CH18 Art 50377, ou similaires.

Note 3: Avec plusieurs triglycérides de référence, il est également possible de calculer la résolution pour la trioléine,

$$\alpha = \text{TR}' / \text{TR}'_{\text{oléine}}$$

en utilisant le temps de rétention corrigé $\text{TR}' = \text{TR} - \text{TR}_{\text{solvant}}$.

Le schéma du log α en fonction du f (nombre de liaisons doubles) permet de déterminer les indices de rétention de tous les triglycérides des acides gras des triglycérides de référence (voir schéma 2).

Note 4: L'efficacité de la colonne doit permettre de séparer nettement le pic des LLL ►C1 (trilinoléine) ◀ de celui des triglycérides possédant un temps de rétention proche.

▼M4

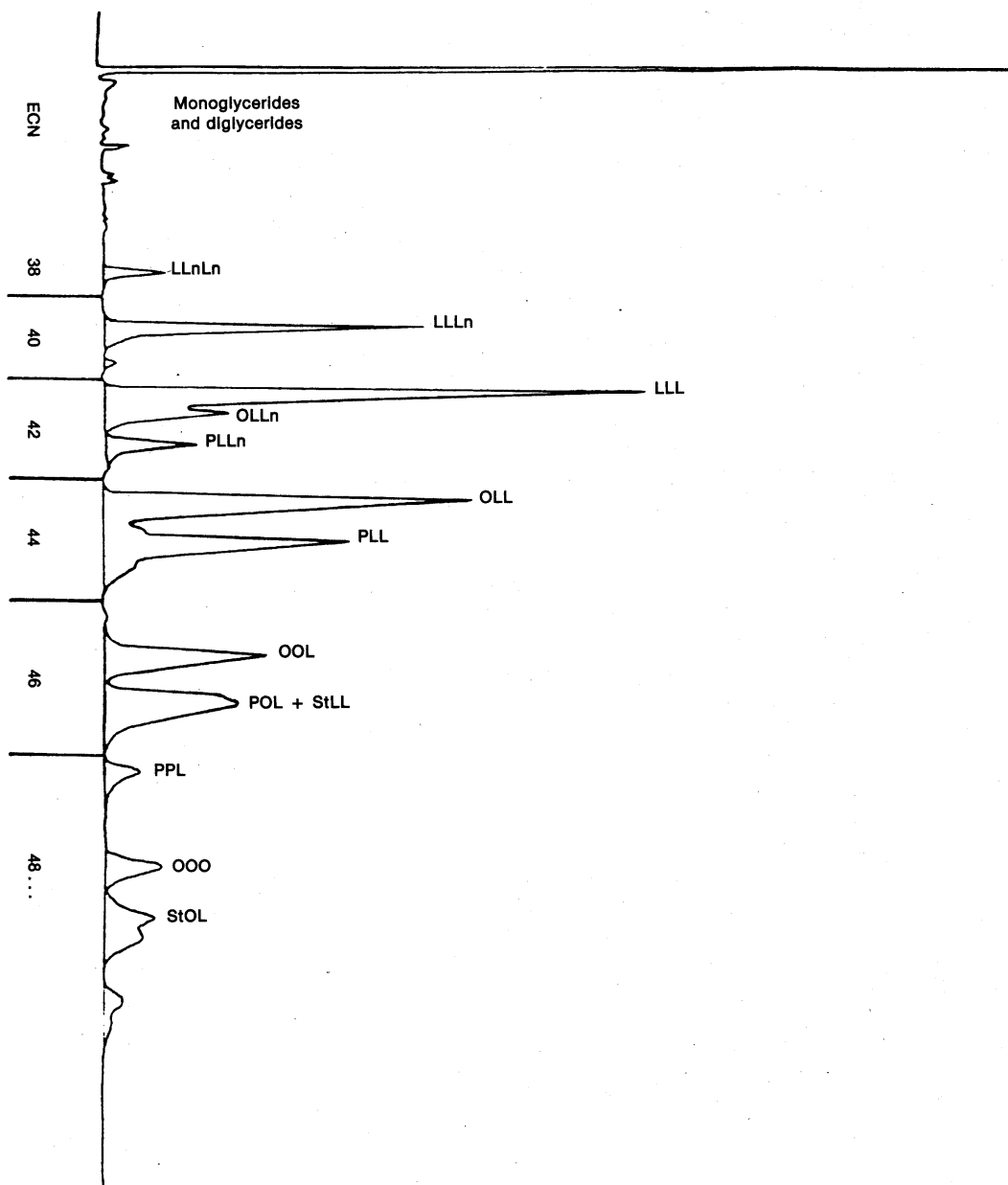
Note 5: Pour les huiles de grignons d'olive brutes, en vue d'obtenir une bonne séparation du pic de la trilinoléine de ceux adjacents, il faut purifier au préalable l'huile conformément au point 6.2 de l'annexe VII, ou, alternativement, on fait absorber 200 µl d'huile, sans les diluer, sur une colonne de silice pour extraction de liquide solide (type SEP PAK silica cartridge-waters port. n° 51 900).

Les triglycérides sont élués avec 20 ml d'hexane anhydre pour HPLC.

Le produit élué est séché dans un courant d'azote et repris en isopropanol ou acétone (5 ml). On injecte 10-20 µl en HPLC. Pour les deux méthodes de purification, il faut contrôler que la composition en acides gras de l'huile soit la même avant et après la purification. Si la composition n'est pas la même, on doit réduire progressivement la qualité d'absorbant utilisé.

▼B

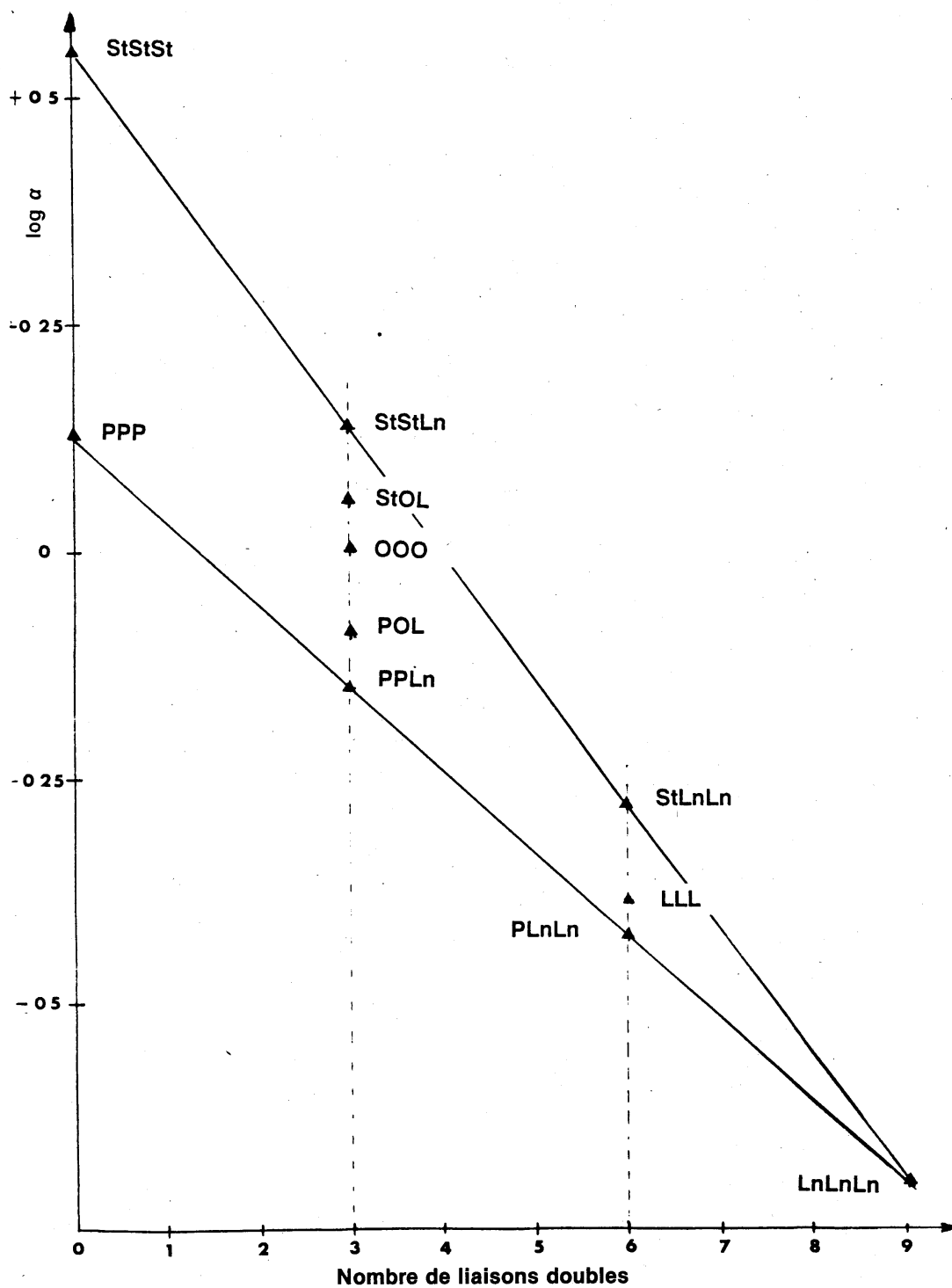
Schéma 1

Chromatogramme d'un échantillon d'huile de soja

Note: P: acide palmitique; St: acide stéarique; O: acide oléique; L: acide linoléique; Ln: acide linolénique.

▼B

Schéma 2

Évolution du $\log a$ en fonction de f (nombre de liaisons doubles)

Note: La: acide laurique; My: acide myristique; P: acide palmitique; St: acide stéarique; O: acide oléique; L: acide linoléique; Ln: acide linoléique.

▼B

ANNEXE IX

ANALYSE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE

PRÉLIMINAIRES

L'examen spectrophotométrique dans l'ultraviolet peut fournir des indications sur la qualité d'une matière grasse, sur son état de conservation et sur les modifications dues aux processus technologiques.

Les absorptions aux longueurs d'onde prévues dans la méthode sont dues à la présence de systèmes diéniques et triéniques conjugués. Les valeurs de ces absorptions sont exprimées comme extinction spécifique E_1 cm 1 % (extinction d'une solution de matière grasse à 1 % dans le solvant prescrit, pour une épaisseur de 1 % cm) noté de façon conditionnelle par K (dit également coefficient d'extinction).

1. OBJET

La méthode décrit le procédé de l'exécution de l'examen spectrophotométrique dans l'ultraviolet des matières grasses.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La matière grasse étudiée est dissoute dans le solvant requis, puis on détermine l'extinction de la solution à la longueur d'onde prescrite, par rapport au solvant pur. On calcule les extinctions spécifiques à partir des lectures spectrophotométriques.

3. APPAREILLAGE

3.1. Spectrophotomètre pour mesure des extinctions dans l'ultraviolet entre 220 et 360 nm, avec possibilité de lecture pour chaque unité nanométrique.

3.2. ►C1 Cuves de quartz ◄, avec couvercle, de parcours optique de 1 centimètre. Les cuves, remplies d'eau ou d'un autre solvant idoine, ne doivent pas présenter de différences supérieures à 0,01 unité d'extinction.

3.3. Fioles jaugées de 25 millilitres.

▼M6

3.4. Colonne pour chromatographie ayant une partie supérieure de 270 mm de long et 35 mm de diamètre ainsi qu'une partie inférieure de 270 mm de long et 10 mm de diamètre.

▼B

4. RÉACTIFS

4.1. Isooctane (2,2,4-triméthylpentane) spectrophotométriquement pur: il doit avoir, par rapport à l'eau distillée, une transmittance non inférieure à 60 % à 220 nm et non inférieure à 95 % à 250 nm

ou bien

— cyclohexane spectrophotométriquement pur: il doit avoir, par rapport à l'eau distillée, une transmittance non inférieure à 40 % à 220 nm et non inférieure à 95 % à 250 nm.

▼M6**▼B**

4.2. Alumine basique pour chromatographie sur colonne, préparée et contrôlée comme décrit dans l'appendice I.

4.3. n-Hexane pour chromatographie.

5. PROCÉDÉ

5.1. L'échantillon examiné doit être parfaitement homogène et exempt d'impuretés en suspension. Les huiles liquides à température ambiante sont filtrées sur papier à une température d'environ 30° C, les graisses solides sont homogénéisées et filtrées à une température non supérieure à 10° C au-dessus de leur température de fusion.

5.2. Peser 0,25 gramme environ de l'échantillon ainsi préparé dans une fiole jaugée de 25 millilitres, compléter avec le solvant prescrit et homogénéiser.

▼B

La solution obtenue doit être parfaitement limpide. Au cas où la solution présenterait une opalescence ou un trouble, filtrer rapidement sur papier.

- 5.3. Remplir une cuve avec la solution obtenue et mesurer les extinctions, en employant comme référence le solvant employé, aux longueurs d'onde comprises entre 232 et 276 nm.

Les valeurs d'extinction lues doivent être comprises dans l'intervalle de 0,1 à 0,8; dans le cas contraire, il est nécessaire de répéter les mesures en utilisant les solutions plus concentrées ou plus diluées appropriées.

- 5.4. Au cas où serait requise la détermination des extinctions spécifiques après passage sur alumine, on procède de la façon suivante: introduire dans la colonne chromatographique 30 grammes d'alumine basique en suspension dans l'hexane; éliminer l'excès d'hexane après tassement de l'absorbant, ou au moins jusqu'à 1 centimètre environ au dessus du niveau supérieure de l'alumine.

Dissoudre 10 grammes de matière grasse, homogénéisée et filtrée comme décrit au point 5.1, dans 100 millilitres d'hexane et verser cette solution dans la colonne. Recueillir l'éluant et évaporer le solvant sous vide et à une température inférieure à 25° C.

Procéder immédiatement sur la matière grasse obtenue comme décrit au point 5.2.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

- 6.1. Rapporter les extinctions spécifiques (coefficients d'extinction) aux différentes longueurs d'onde, calculées comme suit:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s}$$

où:

K_{λ} : extinction spécifique à la longueur d'onde λ ;

E_{λ} : extinction mesurée à la longueur d'onde λ ;

c: concentration de la solution en grammes par 100 millilitres;

s: épaisseur de la cuvette en centimètres

Les résultats sont exprimés avec deux décimales.

- 6.2. L'examen spectrophotométrique de l'huile d'olive selon la méthode officielle des règlements officiels de la Communauté économique européenne prévoit la détermination de l'extinction spécifique, en solution dans l'isooctane, aux longueurs d'onde de 232 et 270 nm et la détermination du ΔK exprimé comme:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

où K_m est l'extinction spécifique à la longueur d'onde m, longueur d'onde d'absorbance maximale aux environs de 270 nm.

▼B*APPENDICE I**Préparation de l'alumine et contrôle de son activité*

A.1.1. Préparation de l'alumine

Mettre dans un récipient, qui ferme hermétiquement, l'alumine au préalable desséchée au four à 380-400° C pendant 3 heures, ajouter de l'eau distillée à raison de 5 millilitres pour 100 grammes d'alumine, fermer rapidement le récipient, agiter à plusieurs reprises, puis laisser reposer pendant au moins 12 heures avant emploi.

A.1.2. Contrôle de l'activité de l'alumine

Préparer une colonne chromatographique avec 30 grammes d'alumine. Opérer comme décrit au paragraphe 5.4. Faire passer à travers la colonne un mélange constitué de:

- 95 % d'huile d'olive vierge, ayant une extinction spécifique à 268 nm inférieure à 0,18,
- 5 % d'huile d'arachide traitée avec des terres décolorantes lors de son raffinage, ayant une extinction spécifique à 268 nm supérieure ou égale à 4.

Si le mélange après passage sur colonne présente une extinction spécifique à 268 nm supérieure à 0,11, l'alumine est acceptable, sinon, il faut augmenter le taux d'hydratation.

▼B*APPENDICE II**Étalonnage du spectrophotomètre*

- A.2. L'appareillage doit être contrôlé périodiquement (au moins tout les six mois), que ce soit pour la correspondance de la longueur d'onde ou pour l'exactitude de la réponse.
- A.2.1. Le contrôle de la réponse de la longueur d'onde peut être fait au moyen d'une lampe à vapeur de mercure ou de filtres appropriés.
- A.2.2. Pour le contrôle de la cellule photoélectrique et du photomultiplicateur, procéder ainsi: peser 0,2 gramme de chromate de potassium pur pour spectrophotométrie et dissoudre dans une solution d'hydroxyde de potassium 0,05 N et compléter au volume dans une fiole jaugée de 1 000 millilitres. Prélever ensuite 25 millilitres exactement de la solution obtenue, transférer dans une fiole jaugée de 500 millilitres et compléter au volume avec la même solution d'hydroxyde de potassium.
- Mesurer l'extinction à 275 nm de la solution ainsi obtenue, en se servant de la solution d'hydroxyde de potassium comme référence. L'extinction mesurée avec une cuve optique de 1 centimètre devra être de $0,200 \pm 0,005$.



ANNEXE X «A»

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ESTERS MÉTHYLIQUES D'ACIDES GRAS1. **DOMAINE D'APPLICATION**

La présente méthode donne des directives générales pour la détermination par chromatographie en phase gazeuse de la composition qualitative et quantitative d'un mélange d'esters méthyliques d'acides gras obtenu selon la méthode visée à l'annexe X B.

La méthode n'est pas applicable aux acides gras polymérisés.

2. **RÉACTIFS**2.1. **Gaz vecteur**

Gaz inerte (azote, hélium, argon, hydrogène, etc.) soigneusement desséché et contenant moins de 10 milligrammes par kilogramme d'oxygène.

Note 1: L'hydrogène que l'on utilise comme gaz vecteur uniquement avec les colonnes capillaires permet de doubler la vitesse d'analyse mais présente des dangers. Il existe cependant des dispositifs de sécurité.

2.2. **Gaz auxiliaires**

2.2.1. Hydrogène (de pureté $\geq 99,9\%$), ne contenant pas d'impuretés organiques.

2.2.2. Air ou oxygène ne contenant pas d'impuretés organiques.

2.3. **Produits d'étalonnage**

Mélange d'esters méthyliques d'acides gras purs, ou esters méthyliques d'un corps gras, de composition connue, si possible voisine de celle du corps gras à analyser.

Prendre toutes précautions afin d'éviter l'oxydation des acides gras poly-insaturés.

3. **APPAREILLAGE**

Les prescriptions fournies concernent les appareils usuels de chromatographie en phase gazeuse utilisant des colonnes remplies et/ou capillaires et un détecteur à ionisation de flamme. Tout appareillage ayant la même efficacité et la même résolution que celles définies au point 5.1.2 convient.

3.1. **Appareil de chromatographie en phase gazeuse**

L'appareil de chromatographie en phase gazeuse doit comprendre les éléments suivants.

3.1.1. **Dispositif d'injection**

Utiliser un dispositif d'injection:

- a) soit avec des colonnes remplies, le dispositif ayant le plus faible volume mort possible (dans ce cas, il doit pouvoir être porté à une température supérieure, de 20° C à 50° C, à celle de la colonne);
- b) soit avec des colonnes capillaires, auquel cas le dispositif doit être spécialement conçu pour l'utilisation de telles colonnes. Il peut être du type diviseur ou du type à injection totale en tête de colonne refroidie (injecteur «non column»).

Note 2: En l'absence de corps gras contenant des acides gras à moins de 16 atomes de carbone, un injecteur à aiguille mobile peut être utilisé.

3.1.2. **Four**

Le four doit être en mesure de porter la colonne à une température d'au moins 260° C et de maintenir la température choisie à 1° C près avec une colonne remplie et à 0,1° C près avec une colonne capillaire. Cette

▼B

dernière caractéristique est particulièrement importante lorsqu'on utilise un tube en silice fondue.

L'utilisation d'un appareil équipé d'un programmeur de température est recommandée dans tous les cas et, en particulier, en présence d'acides gras à moins de 16 atomes de carbone.

3.1.3. Colonne remplie

3.1.3.1. Colonne, en matériau inerte vis-à-vis des corps à analyser: verre ou, à défaut, acier inoxydable, ayant les dimensions suivantes:

- a) longueur: de 1 à 3 mètres. Une colonne relativement courte sera utilisée dans le cas où des acides gras à longue chaîne ($> C_{20}$) sont présents. Dans le cas de la détermination des acides en C_4 et en C_6 , il est recommandé d'utiliser une colonne de 2 m;
- b) diamètre intérieur: de 2 à 4 millimètres.

Note 3: Si des constituants polyinsaturés à plus de trois doubles liaisons sont présents, une colonne en acier inoxydable peut provoquer leur décomposition.

Note 4: Un système à double colonne remplie peut être utilisé.

3.1.3.2. Remplissage, comprenant les éléments suivants:

- a) support: terre de diatomées lavée aux acides et silanisée, ou tout autre support inerte pouvant convenir, avec un étroit intervalle de granulométrie (25 micromètres entre 125 et 200 micromètres), la dimension moyenne étant liée au diamètre intérieur et à la longueur de la colonne;
- b) phase stationnaire: phase polaire de type polyester (par exemple polysuccinate de diéthylèneglycol, polysuccinate de butanediol, polyadipate d'éthylèneglycol, etc.), cyanosilicones ou toute autre phase permettant la séparation chromatographique (voir article 5). Le taux d'imprégnation sera compris entre 5 % (m/m) et 20 % (m/m). Pour certaines séparations, des phases apolaires pourront être utilisées.

3.1.3.3. Conditionnement de la colonne

Après avoir déconnecté la colonne du côté du détecteur, porter progressivement le four à 185° C et maintenir la colonne venant d'être préparée sous un courant de gaz inerte de 20 à 60 millilitres par minute durant au moins 16 heures à cette température, puis durant 2 heures à 195° C.

3.1.4. Colonne capillaire

3.1.4.1. Tube en matériau inerte vis-à-vis des corps à analyser, généralement en verre ou en silice fondue. Le diamètre interne doit être compris entre 0,2 et 0,8 millimètre. Intérieurement, il devra subir des traitements appropriés (préparation de l'état de surface, inactivation) avant de recevoir le film de phase stationnaire. Une longueur de 25 mètres est suffisante dans la plupart des cas.

3.1.4.2. Phase stationnaire, principalement de type polyglycols [poly(éthylène glycol) 20 000], polyesters (polysuccinate de butanediol) ou polysiloxanes polaires (cyanosilicones). Les colonnes greffées, ou réticulées, conviennent.

Note 5: Toutefois les polysiloxanes polaires risquent de donner des difficultés dans l'identification et la séparation de l'acide linoléique et des acides en C_{20} .

Les épaisseurs de film doivent être faibles: 0,1 à 0,2 micromètre.

3.1.4.3. Montage et conditionnement de la colonne

Respecter les précautions habituelles de montage des colonnes capillaires, c'est-à-dire la disposition de la colonne dans le four (support), le choix et le montage des joints (étanchéité), le positionnement des extrémités de la colonne dans l'injecteur et le détecteur (réduction des volumes morts). Mettre la colonne sous gaz vecteur [par exemple, 0,3 bar (30 kPa) pour une colonne de 25 mètres de longueur et d'un diamètre intérieur de 0,3 millimètre].

Conditionner la colonne par programmation de la température du four à 3° C par minute depuis la température ambiante jusqu'à une température inférieure à 10° C à la limite de décomposition de la phase stationnaire. Maintenir à cette température 1 heure, jusqu'à stabilisation de la ligne de base. Revenir à 180° C pour travailler dans des conditions isothermes.

▼B

Note 6: Des colonnes préconditionnées adéquates sont disponibles commercialement.

- 3.1.5. Détecteur, de préférence capable d'être porté à une température supérieure à celle de la colonne.

3.2. **Seringue**

La seringue doit avoir une capacité de 10 ► **C1** microlitres au maximum et être graduée en 0,1 microlitres ◄.

3.3. **Enregistreur**

Lorsque la courbe enregistrée est utilisée pour calculer la composition du mélange analysé, l'enregistreur doit être un appareil électronique de grande précision, compatible avec l'appareillage utilisé, et ayant les caractéristiques suivantes:

- a) vitesse de réponse inférieure à 1,5 seconde, de préférence 1 seconde (la vitesse de réponse est le temps nécessaire pour que la plume de l'enregistreur aille de 0 à 90 % lors de l'introduction soudaine d'un signal de 100 %);
- b) largeur du papier, 20 centimètres au minimum;
- c) vitesse de déroulement du papier, réglable à des valeurs comprises entre 0,4 et 2,5 centimètres par minute.

3.4. **Intégrateur ou calculateur (facultatif)**

L'emploi d'un intégrateur électronique ou d'un calculateur permet un calcul rapide et précis. Celui-ci doit fournir une réponse linéaire, avoir une sensibilité suffisante, et la correction de la déviation de la ligne de base doit être satisfaisante.

4. **MODE OPÉRATOIRE**

Les détails opératoires donnés en 4.1 à 4.3 concernent l'emploi d'un détecteur à ionisation de flamme.

En variante, un appareil de chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) peut être utilisé. Les conditions opératoires doivent alors être modifiées comme décrit à l'article 6.

4.1. **Conditions d'essai**

- 4.1.1. Choix des conditions optimales de travail

4.1.1.1. Sur colonne remplie

Pour choisir les conditions de travail, il y a lieu de tenir compte des variables suivantes:

- a) la longueur et le diamètre de la colonne;
- b) la nature et la quantité de la phase stationnaire;
- c) la température de la colonne;
- d) le débit du gaz vecteur;
- e) la résolution souhaitée;
- f) l'importance de la prise d'essai, choisie de façon telle que l'ensemble détecteur-électromètre fournisse une réponse linéaire;
- g) la durée de l'analyse.

En général, les valeurs données dans le tableau 1 et le tableau 2 seront celles donnant les résultats désirés, à savoir un nombre de plateaux théoriques, au moins égal à 2 000 par mètre de colonne pour le stéarate de méthyle, et élution de celui-ci en 15 minutes environ.

Lorsque l'appareil le permet, l'injecteur devrait être à une température voisine de 200° C, et le détecteur à une température égale ou supérieure à celle de la colonne.

En général, le rapport du débit d'hydrogène du détecteur à ionisation de flamme à celui du gaz vecteur, varie de 1:2 à 1:1, selon le diamètre de la colonne. Le débit d'oxygène est d'environ 5 à 10 fois celui de l'hydrogène.

▼ **B**

Tableau 1

Diamètre intérieur de la colonne (en mm)	Vitesse du gaz vecteur (en ml/min)
2	15 à 25
3	20 à 40
4	40 à 60

Tableau 2

Concentration de la phase stationnaire [en % (m/m)]	Température de la colonne (en °C)
5	175
10	180
15	185
20	185

4.1.1.2. Sur colonne capillaire

Les caractéristiques d'efficacité et de perméabilité des colonnes capillaires font que la séparation entre constituants et la durée de l'analyse sont très dépendantes du débit de gaz vecteur dans la colonne. Il y aura nécessité, en jouant sur ce paramètre (ou plus simplement sur la perte de charge en tête de colonne), d'optimiser les conditions opératoires selon que l'on recherche, soit à améliorer les séparations, soit à faire de l'analyse rapide.

4.1.2. Détermination du nombre de plateaux théoriques (efficacité) et de la résolution

(Voir figure 1)

Effectuer l'analyse d'un mélange de stéarate et d'oléate de méthyle en proportions sensiblement équivalentes (par exemple, esters méthyliques de beurre de cacao).

Choisir l'importance de la prise d'essai, la température de la colonne et le débit du gaz vecteur, de façon que le maximum du pic du stéarate de méthyle soit enregistré environ 15 minutes après le pic du solvant, et que ce pic corresponde à environ les trois quarts de l'échelle totale.

Calculer le nombre de plateaux théoriques, n , à l'aide de la formule

$$n = 16 \left[\frac{d_{r1}}{W_1} \right]^2$$

et la résolution R , par la formule

$$R = \frac{2\Delta}{W_1 + W_2}$$

où:

$d_{r(1)}$: distance de rétention, en millimètres, mesurée à partir du début du chromatogramme jusqu'au maximum du pic du stéarate de méthyle;

$w_{(1)}$ et $w_{(2)}$: largeurs, en millimètres, des pics du stéarate et de l'oléate de méthyle, mesurées entre les points d'intersection avec la ligne de base des tangentes aux points d'inflexion de la courbe;

Δ : distance, en millimètres, entre les maxima relatifs des pics du stéarate et de l'oléate de méthyle;

▼ **M2**

et l'indice de résolution I_r , par la formule

$$\frac{a}{b}$$

▼ **M2**

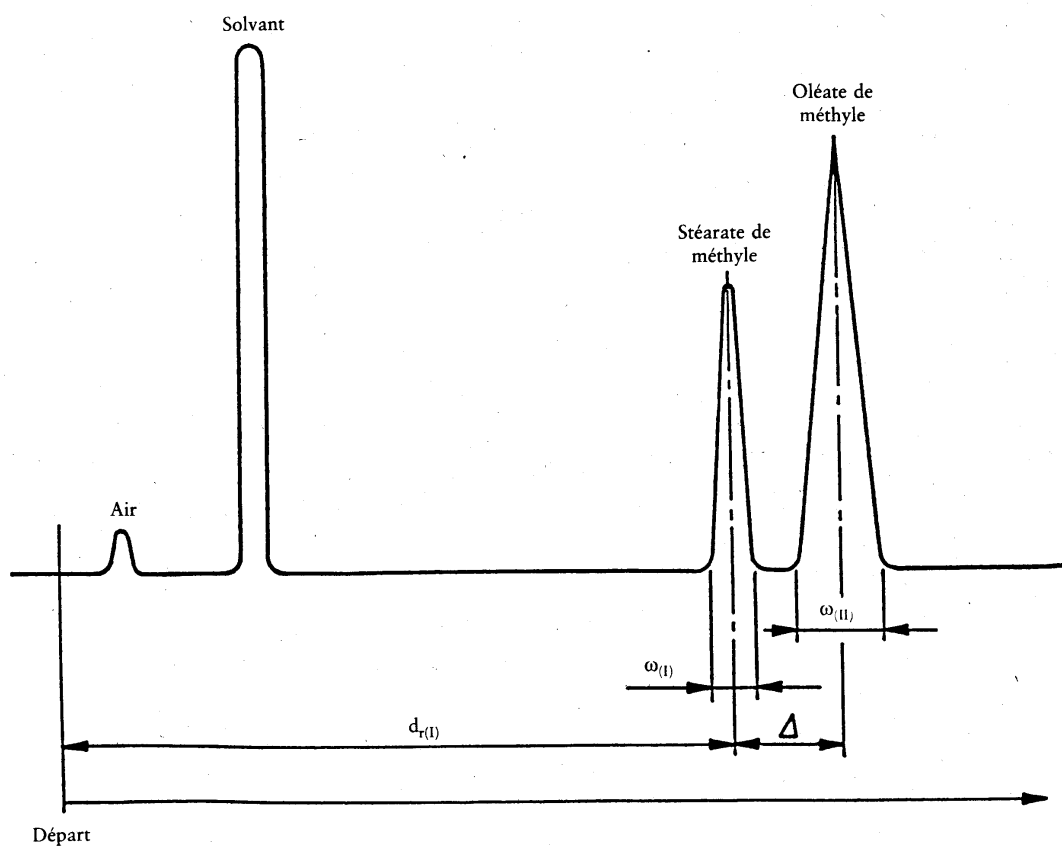
où:

- a = la hauteur du pic le plus petit, mesurée par rapport à la ligne de base,
- b = la hauteur du point le plus bas du val compris entre les deux pics adjacents, mesurée par rapport à la ligne de base.

▼ **B**

Figure 1

Chromatogramme pour la détermination du nombre de plateaux théoriques (efficacité) et de la résolution.



Les conditions opératoires sont celles donnant un nombre de plateaux théoriques pour le stéarate de méthyle, au moins égal à 2 000 par mètre de colonne, et une résolution d'au moins 1.25.

4.2. **Prise d'essai**

À l'aide de la seringue (4.2), prélever de 0,1 à 2 microlitres de la solution d'esters méthyliques obtenue selon la méthode visée à l'annexe X «B» et les injecter dans la colonne.

Dans le cas des esters exempts de solvants, préparer une solution à 100 milligrammes par millilitre environ dans de l'heptane pour chromatographie en phase gazeuse et injecter 0,1 à 1 microlitre de cette solution.

Pour la recherche de constituants présents à l'état de traces, cette prise d'essai pourra être augmentée (jusqu'à dix fois).

4.3. **Analyse**

Dans les cas usuels, opérer dans les conditions décrites en 5.1.1.

Toutefois, il est possible d'opérer avec une température de colonne plus basse, dans le cas où il est nécessaire de doser des acides gras dont le nombre d'atomes de carbone est inférieur à 12, ou plus élevée, dans le cas où il est nécessaire de doser des acides gras dont le nombre d'atomes de carbone est supérieur à 20.

Éventuellement, il est possible d'opérer en température programmée dans les deux cas. Par exemple, si l'échantillon contient des esters

▼B

méthyliques d'acides gras à moins de 12 atomes de carbone, injecter l'échantillon à 100° C (ou à 50-60° C si l'acide butyrique est présent) et programmer immédiatement à un débit de 4 à 8° C par minute jusqu'à la température optimale. Dans certains cas les deux procédés peuvent être combinés.

Après la période de programmation de température, continuer l'élution en température isotherme jusqu'à élution de tous les constituants. Si l'appareil ne peut pas travailler en température programmée, opérer à deux températures fixées entre 100 et 195° C.

Si nécessaire, il est recommandé de faire une analyse sur deux phases fixes de polarités différentes pour vérifier l'absence de pics masqués, par exemple dans le cas de la présence simultanée de C_{18:3} et C_{20:0} ou de C_{18:3} et C_{18:2} conjugués.

4.4. Préparation du chromatogramme de référence et des courbes de référence

Analyser le mélange témoin (voir point 2.3), dans les conditions opératoires identiques à celles de l'essai, et déterminer les temps de rétention ou les distances de rétention pour les acides gras constitutifs. Tracer sur papier semi-logarithmique pour chaque taux d'insaturation, les courbes donnant le logarithme du temps de rétention ou de la distance de rétention en fonction du nombre d'atomes de carbone; dans des conditions isothermes et pour des esters à chaîne droite et un taux d'insaturation fixé, ces courbes doivent être des droites. Ces droites doivent être pratiquement parallèles.

Éviter les conditions opératoires favorisant l'existence de «pics masqués», c'est-à-dire que deux constituants ne puissent être distingués par suite d'une résolution insuffisante.

5. EXPRESSION DES RÉSULTATS

5.1. Analyse qualitative

Pour l'essai, identifier les pics du méthyl ester en se reportant aux courbes préparées au point 4.4 au besoin en interpolant.

5.2. Analyse quantitative

5.2.1. Détermination de la composition

Utiliser la méthode de normalisation interne (sauf exceptions), c'est-à-dire admettre que la totalité des constituants présents dans l'échantillon est représentée sur le chromatogramme, donc que la somme des aires des pics représente 100 % des constituants (élution totale).

Si l'appareillage comporte un intégrateur, utiliser les chiffres fournis par celui-ci. Dans le cas contraire, déterminer l'aire de chaque pic en multipliant la hauteur du pic par sa largeur à mi-hauteur, en tenant compte des diverses atténuations éventuellement utilisées au cours de l'enregistrement.

5.2.2. Mode de calcul

5.2.2.1. Cas général

Calculer la teneur en un constituant donné, exprimée en pourcentage en masse, des esters méthyliques, en déterminant le pourcentage représenté par le rapport de l'aire du pic correspondant à la somme des aires de la totalité des pics, à l'aide de la formule:

$$\frac{A_i}{\Sigma A} \times 100$$

où:

A_i: aire du pic correspondant au composé i;

ΣA: somme des aires de la totalité des pics.

Donner le résultat avec une décimale.

Note 7: Dans ce cas général, le résultat du calcul basé sur les aires relatives est considéré représenter un pourcentage en masse. Dans le cas où cette hypothèse n'est pas permise, voir le point 5.2.2.2.

5.2.2.2. Cas de l'emploi des facteurs de correction

▼B

Dans certains cas, par exemple en présence d'acides gras dont le nombre d'atomes de carbone est inférieur à 8 ou d'acides à fonctions secondaires, lors de l'emploi de détecteurs à conductivité thermique, ou si le plus grand degré de précision est spécialement demandé, il y a lieu de faire intervenir des facteurs de correction pour convertir les pourcentages des aires des pics en pourcentages en masse des constituants.

Déterminer les facteurs de correction à l'aide d'un chromatogramme obtenu à partir d'un mélange témoin d'esters méthyliques de composition exactement connue dans des conditions identiques à celles de l'essai.

Pour ce mélange témoin, le pourcentage en masse du composé i est donné par la formule:

$$\frac{m_i}{\Sigma m} \times 100$$

où:

m_i : masse du composé i dans le mélange témoin.

Σm : somme des masses des divers constituants du mélange témoin.

À partir du chromatogramme du mélange témoin (4.4), calculer le pourcentage (aire/aire) du composé i comme suit:

$$\frac{A_i}{\Sigma A} \times 100$$

où:

A_i : aire du pic correspondant au composé i ;

ΣA : somme des aires de la totalité des pics.

D'où, le facteur de correction:

$$K_i = \frac{m_i \times \Sigma A}{A_i \times \Sigma m}$$

Habituellement, les facteurs de correction sont exprimés par rapport à $K_{C_{16}}$ et les facteurs relatifs deviennent:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C_{16}}}$$

Pour l'échantillon, la teneur en chaque composé i , exprimée en pourcentage en masse des esters méthyliques, est:

$$\frac{K'_i \times A_i}{\Sigma (K'_i \times A_i)} \times 100$$

Donner le résultat avec une décimale.

5.2.2.3. Cas de l'emploi d'un étalon interne

Dans certaines analyses (par exemple, lorsque tous les acides gras ne sont pas quantifiés, et que des acides en C_4 et en C_6 sont présents à côté d'acides en C_{16} et en C_{18} , ou bien lorsqu'il est nécessaire de déterminer la quantité absolue d'acides gras dans un échantillon), il est nécessaire d'utiliser un étalon interne. Des acides gras en C_5 , C_{15} ou C_{17} sont utilisés fréquemment. Le facteur de correction de l'étalon interne doit être déterminé (s'il y a lieu).

Le pourcentage en masse du composé i , exprimé en esters méthyliques, est par suite donné par la formule:

$$\frac{m_s \times K'_i \times A_i}{m \times K'_s \times A_s} \times 100$$

où:

A_i : surface du pic correspondant au constituant i ;

A_s : surface du pic correspondant à l'étalon interne;

K'_i : facteur de correction du composé i (relatif à $K_{C_{16}}$);

K'_s : facteur de correction de l'étalon interne (relatif à $K_{C_{16}}$);

▼B

m: masse, en milligrammes, de l'échantillon;

m_s: masse, en milligrammes, de l'étalon interne.

Donner le résultat avec une décimale.

▼M2

6. CAS PARTICULIER DE LA DÉTERMINATION DES ISOMÈRES «TRANS»

Il est possible de déterminer le contenu des isomères «trans» des acides gras avec un nombre d'atomes de carbone compris entre 10 et 24, par séparation des esters méthyliques, en utilisant des colonnes chromatographiques capillaires présentant une polarité particulière.

6.1. Colonne capillaire en silice d'un diamètre interne de 0,25 à 0,32 millimètre et d'une longueur de 50 mètres, recouverte de cyanopropylsilicone, l'épaisseur du film étant comprise entre 0,1 et 0,3 micromètre (type SP 2340, type SP 2380, C.P. sil 88, Silor 10 et types similaires).

6.2. Les esters méthyliques sont préparés selon le procédé B présenté dans l'autre annexe (X/B). Les substances grasses ayant une acidité libre supérieure à 3 % doivent être préalablement neutralisées conformément au point 6.1 de l'annexe VII.

6.3. Les conditions de travail pour la chromatographie en phase gazeuse sont dans l'ensemble les suivantes:

- température de la colonne programmée de 150 °C à 230 °C (par exemple 165 °C pendant 15 minutes puis augmentation de 5 °C par minute jusqu'à 200 °C),
- température de l'injecteur: 250 °C si on utilise le système d'injecteur diviseur ou la température initiale de la colonne si on emploie le système *on column*,
- température du détecteur: 260 °C,
- débit du gaz vecteur (hélium et hydrogène): 1,2 millilitre par minute.

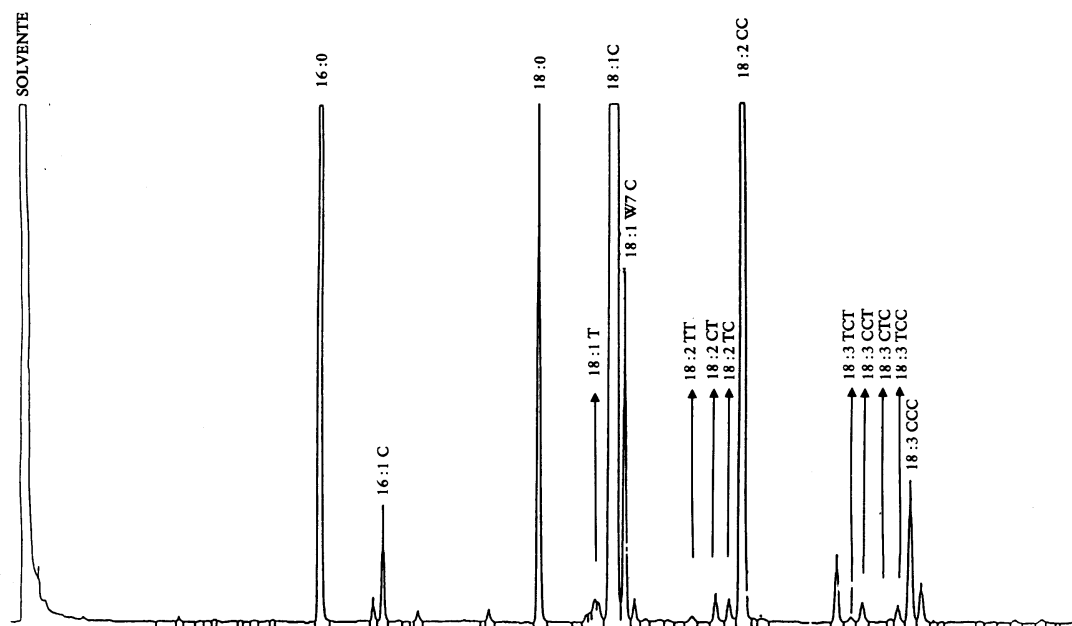
La quantité injectée doit être telle que dans les conditions de sensibilité employées la hauteur du pic correspondant à l'ester méthylique de l'acide arachidique soit égale ou supérieure à 20 % du bas de l'échelle.

6.4. L'identification des divers esters méthyliques s'effectue sur la base des temps de rétention qui sont comparés à ceux de mélanges de référence. (Comme indiqué au point 2.3).

Les esters des acides gras «trans» sont élués avant les isomères correspondants «cis». Un exemple de chromatogramme est présenté dans la figure 2.

▼ **M2****Figure 2**

Chromatographie type en phase gazeuse relative à la détermination des isomères trans des acides gras avec colonne capillaire



- 6.5. L'efficacité de la colonne déterminée selon le point 4.1.2 doit permettre une séparation de certains couples critiques, par exemple le couple formé par le massif des acides transoléiques et le pic de l'acide oléique, trans C 18: 1/ «cis» C 18: 1, avec un indice de résolution supérieur à 2.
- 6.6. Le pourcentage des divers acides gras «trans» est calculé sur la base du rapport entre la surface du pic y afférent et la somme des surfaces de tous les pics présents.

Sont pris en considération les pourcentages des acides:

- «trans» octadécénoïques (T 18: 1), indiqués à l'annexe I du présent règlement comme somme des isomères transoléiques,
- «cis-trans» et «trans-cis» octadécadiénoïques [(CT/TC) 18: 2] indiqués à l'annexe I du présent règlement comme somme des isomères translinoléiques,
- «trans-cis-trans», «cis-cis-trans», «cis-trans-cis», «trans-cis-cis», octadécatriénoïques [(TCT + CCT + CTC + TCC) 18: 3], indiqués à l'annexe I du présent règlement comme somme des isomères translinoléiques.

Note 8: Compte tenu des caractéristiques particulières de cette méthode, donner les résultats avec deux décimales.

▼ **B**

► **M2** 7. ◀ CAS PARTICULIER DE L'UTILISATION D'UN DÉTECTEUR À CONDUCTIBILITÉ THERMIQUE (CATHAROMÈTRE)

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à conductibilité thermique (catharomètre), peut être utilisé également pour la détermination de la composition qualitative et quantitative d'un mélange d'esters méthyliques d'acides gras. Dans ce cas, les conditions spécifiées aux points 3 et 4, doivent être modifiées comme indiqué dans le tableau 3.

Pour l'analyse quantitative, utiliser les facteurs de correction définis en 5.2.2.2.

▼ **B**

Tableau 3

Variable	Valeur/condition
Colonne	Longueur: 2 à 4 m diamètre intérieur: 4 mm
Support	Granulométrie entre 160 et 200 µm
Taux d'imprégnation de la phase stationnaire	15 à 25 % (m/m)
Gaz vecteur	Hélium, ou à défaut hydrogène, à teneur aussi faible que possible en oxygène
Gaz auxiliaires	Néant
Température de l'injecteur	De 40 à 60 °C supérieure à celle de la colonne
Température de la colonne	180 à 200 °C
Débit du gaz vecteur	Généralement compris entre 60 et 80 ml/min
Quantités injectées	Généralement comprises entre 0,5 et 2 µl

► **M2** 8. ◀ **RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit indiquer les méthodes utilisées pour la préparation des esters méthyliques et pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, ainsi que les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.



ANNEXE X «B»

**PRÉPARATION DES ESTERS MÉTHYLIQUES D'ACIDES GRAS,
CONFORMÉMENT À L'ANNEXE VI POINTS I ET II DU RÈGLEMENT
(CEE) N° 72/77 OU SELON LA MÉTHODE ALTERNATIVE DÉCRITE
CI-DESSOUS**

PRÉAMBULE

Le choix de la méthode à suivre doit être fonction de la composition en acides et de l'acidité de la matière grasse à analyser et de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse à effectuer.

On notera en particulier:

- que, en ce qui concerne les matières grasses contenant des acides gras inférieurs à C₁₂, seules doivent être utilisées les méthodes d'analyse en fiole fermée ou au sulfate diméthylque,
- que, en ce qui concerne les matières grasses ayant une acidité supérieure à 3 %, seules doivent être utilisées les méthodes au méthanol et à l'acide chlorhydrique ou au sulfate diméthylque,
- que, pour les déterminations par chromatographie en phase gazeuse des isomères trans, seules doivent être utilisées les méthodes au méthylate de sodium ou au sulfate diméthylque,
- que la méthode au méthanol, à l'hexane et à l'acide sulfurique doit être utilisée pour la préparation des esters méthyliques de petites quantités de matières grasses provenant de séparation par chromatographie sur couche mince.

La présence d'insaponifiables peut être négligée pour autant qu'elle ne dépasse pas 3 % autrement, les esters méthyliques doivent être préparés à partir des acides gras.

1. OBJET

On trouvera ci-dessous la description de cinq méthodes de préparation des esters méthyliques de matières grasses:

- a) au méthylate de sodium;
- b) au méthylate de sodium en fiole fermée;
- c) au méthanol et à l'acide chlorhydrique en fiole fermée;
- d) au sulfate diméthylque;
- e) au méthanol, à l'hexane et à l'acide sulfurique.

Méthode A

2. PRINCIPE

La matière grasse à analyser est chauffée à reflux à l'aide d'alcool méthylique et de méthylate de sodium. Les esters méthyliques obtenus sont extraits à l'éther éthylique.

3. MATÉRIEL

- 3.1. Ballon de 100 millilitres avec réfrigérant à reflux, muni à l'extrémité supérieure d'un tube à chaux soudée, avec joints rodés.
- 3.2. ► **C1** Éprouvettes ◀ graduées de 50 millilitres.
- 3.3. Pipette graduée de 5 millilitres, avec subdivisions de 0,1 millilitre.
- 3.4. Ampoules à décanter de 250 millilitres.
- 3.5. Ballon de 200 millilitres.

4. RÉACTIFS

- 4.1. Méthanol anhydre.
- 4.2. Méthylate de sodium, solution méthanolique à 1 % environ: cette solution se prépare en dissolvant 0,34 gramme de sodium métallique dans 100 millilitres de méthanol anhydre.
- 4.3. Éther éthylique.
- 4.4. Chlorure de sodium, solution à 10 %.

▼B

4.5. Éther de pétrole à 40-60 °C.

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. Dans le ballon de 100 millilitres, introduire 2 grammes de matière grasse préalablement déshydratée au sulfate de sodium et filtrée. Ajouter 35 millilitres de méthanol, adapter le réfrigérant et faire bouillir à reflux durant quelques minutes.

5.2. Interrompre le réchauffement, détacher le réfrigérant et ajouter rapidement 3,5 millilitres de solution de méthylate de sodium; relier le réfrigérant et faire bouillir à reflux durant 3 heures au moins. La méthylation est considérée comme complète quand toute la matière grasse est passée dans la solution et que le mélange de réaction est parfaitement limpide à température ambiante.

5.3. Refroidir et verser le mélange de réaction dans une ampoule à décanter de 250 millilitres, ajouter 35 à 40 millilitres d'éther éthylique, 100 millilitres d'eau et 5 à 6 millilitres de solution de chlorure de sodium à 10 %. Agiter et attendre la séparation des strates: la phase aqueuse est transférée dans une deuxième ampoule à décanter et à nouveau extraite avec 25 millilitres d'éther éthylique.

Ajouter à l'ensemble des extraits étherés 50 millilitres d'éther de pétrole à 40-60 °C; cela provoque la séparation de l'eau qui doit être éliminée.

Laver trois fois la phase étherée avec des doses de 10 à 15 millilitres d'eau, sécher sur le sulfate de sodium et filtrer sur papier en recueillant le filtrat dans le ballon de 200 millilitres.

Distiller le solvant en en complétant l'allongement au bain-marie dans un courant d'azote pur.

Méthode B

2. PRINCIPE

La matière grasse à analyser doit être traitée au méthylate de sodium en solution méthanolique, en fiole fermée, à 85-90 °C.

3. MATÉRIEL

3.1. Fiole de verre à parois robustes, d'environ 5 millilitres (hauteur 40 à 45 millimètres; diamètre 14 à 16 millimètres).

3.2. Pipette graduée d'1 millilitre avec subdivisions de 0,1 millilitre.

4. RÉACTIFS

4.1. Méthylate de sodium, solution méthanolique à ►C1 1,5 % environ ◄. Cette solution se prépare en dissolvant 0,50 gramme de sodium métallique dans 100 millilitres de méthanol anhydre.

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. Dans la fiole de verre, introduire 2 grammes de matière grasse préalablement déshydratée au sulfate de sodium et filtrée. Ajouter 0,3 gramme (environ 0,4 millilitre) de solution de méthylate de sodium et fermer la fiole à la flamme.

5.2. Maintenir la fiole pendant deux heures dans un bain à 85-92 °C et agiter de temps en temps; c'est la limpidité du contenu de la fiole qui, après, sédimentation de la glycérine et du résidu des réactifs, indique l'estérification.

5.3. Ramener à température ambiante. Ouvrir la fiole au moment de l'emploi des esters méthyliques. Ceux-ci ne demandent pas d'autre manipulation avant l'introduction dans le chromatographe en phase gazeuse.

Méthode C

2. PRINCIPE

La matière grasse à analyser doit être traitée au méthanol et à l'acide chlorhydrique, en fiole fermée, à 100 °C.

▼B

3. MATÉRIEL

- 3.1. Fiole de verre, à parois robustes, d'environ 5 millilitres (hauteur 40 à 45 millimètres; diamètre 14 à 16 millimètres).
- 3.2. Pipettes graduées d'1 et de 2 millimètres.

4. RÉACTIFS

- 4.1. Solution méthanolique d'acide chlorhydrique à 2 %. À préparer avec de l'acide chlorhydrique gazeux et du méthanol anhydre (note 1).
- 4.2. Hexane pour chromatographie en phase gazeuse.

5. MODE OPÉRATOIRE

- 5.1. Introduire dans la fiole de verre 0,2 gramme de matière grasse préalablement déshydratée au sulfate de sodium et filtrée, ainsi que 2 millilitres de solution méthanolique d'acide chlorhydrique. Fermer la fiole à la flamme.
- 5.2. Maintenir la fiole dans un bain à 100 °C durant quarante minutes.
- 5.3. Refroidir la fiole à l'eau courante, ouvrir, ajouter 2 millilitres d'eau distillée et 1 millilitre d'hexane. Centrifuger et prélever la phase hexanique, qui est prête à l'emploi.

Méthode D

2. PRINCIPE

La matière grasse à analyser est saponifiée avec une solution méthylalcoolique d'hydroxyde de potassium, puis traitée au sulfate diméthylique. Après addition d'acide chlorhydrique, la séparation des esters méthyliques qui se sont formés s'opère spontanément. Après traitement à l'alumine, on obtient des esters méthyliques d'une grande pureté.

3. MATÉRIEL

- 3.1. ► **C1** Erlen en verre ◀, à parois robustes, d'une capacité de 20 millilitres environ, avec bouchon rodé 10/19 et crochets de sécurité.
- 3.2. Réfrigérants à reflux à cinq boules, attache rodée 10/19.
- 3.3. Filtres de verre à septum poreux, gradation G 2, diamètre 20 millimètres.
- 3.4. Éprouvettes de verre, d'une capacité de 10 millilitres environ, à fond conique.
- 3.5. Seringues d'1 et de 5 millilitres.

4. RÉACTIFS

- 4.1. Hydroxyde de potassium, solution à 10 % dans l'alcool méthylique pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.2. Indicateur vert de bromocrésol: solution à 0,05 % dans l'alcool méthylique.
- 4.3. Sulfate diméthylique (d = 1,335 à 15 °C).
- 4.4. Acide chlorhydrique concentré (d = 1,19) dilué 1 + 1 dans l'alcool méthylique pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.5. Oxyde d'aluminium standardisé selon Brockmann pour chromatographie d'absorption.

5. MODE OPÉRATOIRE

- 5.1. Introduire dans l'éprouvette de 20 millilitres environ 2,2 millilitres de matière grasse préalablement déshydratée au sulfate de sodium et filtrée, ajouter 5 millilitres de la solution d'hydroxyde de potassium et quelques granulés de quartz pour régulariser l'ébullition. Adapter le réfrigérant à reflux et chauffer à flamme faible durant 5 minutes en agitant: la saponification est complète lorsque la solution est limpide. Refroidir alors à l'eau courante et détacher le réfrigérant.
- 5.2. Ajouter deux gouttes d'indicateur et, à l'aide d'une seringue, 1 millilitre de sulfate diméthylique, lentement. Fermer hermétiquement l'éprouvette et agiter 2 ou 3 minutes, en plongeant fréquemment le fond de l'éprouvette dans un bain-marie en ébullition: la réaction est complète lorsque l'indicateur vire du bleu au jaune. Refroidir alors l'éprouvette à l'eau courante, puis

▼B

ouvrir et ajouter 5 millilitres de la solution méthanolique d'acide chlorhydrique.

- 5.3. Après avoir agité pendant quelques secondes, mettre l'éprouvette dans une position inclinée, lui imprimer de faibles secousses facilitant l'affleurement des esters méthyliques sous la forme d'une masse huileuse (note A).

Prélever les esters méthyliques au moyen d'une seringue, les introduire dans une éprouvette à fond conique, ajouter un volume d'alumine égal à un quart environ du volume des esters méthyliques, agiter et filtrer sur papier.

Note A: Si la séparation des esters méthyliques ne se produit pas spontanément, ajouter 5 millilitres d'eau dans l'éprouvette et agiter.

Méthode E**2. PRINCIPE**

La matière grasse à analyser est chauffée à l'aide d'un système à reflux, avec du méthanol, de l'hexane et de l'acide sulfurique. Les esters méthyliques obtenus sont extraits à l'éther de pétrole.

3. MATÉRIEL

- 3.1. ► **C1** Erlen ◀ d'environ 20 millilitres, muni d'un réfrigérant à reflux à air, d'une longueur d'1 mètre environ, avec joints rodés.
- 3.2. Pipette graduée de 5 millilitres.
- 3.3. Ampoule à décanter de 50 millilitres.
- 3.4. Tubes gradués de 10 et de 25 millilitres.
- 3.5. Éprouvette de 15 millilitres, à fond conique.

4. RÉACTIFS

- 4.1. Réactifs de méthylation: méthanol anhydre, hexane, acide sulfurique concentré ($d = 1,84$), dans un rapport de 75:25:1 (V/V/V).
- 4.2. Éther de pétrole à 40-60 °C.
- 4.3. Sulfate de sodium anhydre.

5. MODE OPÉRATOIRE

- 5.1. Dans l'éprouvette de 20 millilitres, introduire les produits provenant de la plaque et ajouter 5 millilitres de réactif de méthylation.
- 5.2. Adapter le réfrigérant à reflux et chauffer durant 30 minutes dans un bain-marie bouillant (note 2).
- 5.3. Transférer le mélange dans une ampoule à décanter de 50 millilitres, à l'aide de 10 millilitres d'eau distillée et de 10 millilitres d'éther de pétrole. Agiter vigoureusement, attendre la séparation de phases, allonger la strate aqueuse et laver la strate étherée deux fois avec 20 millilitres d'eau distillée. Ajouter dans l'ampoule à décanter une petite quantité de sulfate de sodium anhydre, agiter, laisser reposer durant quelques minutes et filtrer, recueillir ensuite le filtrat dans une éprouvette de 15 millilitres à fond conique.

Évaporer le solvant au bain-marie, dans un courant d'azote.

Note 1: Il est possible de préparer aisément de petites quantités d'acide chlorhydrique gazeux en laboratoire en modifiant la solution disponible dans le commerce ($\rho = 1,18$) par ajout de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ($\rho = 1,84$). Le gaz libéré peut être facilement séché si on le fait barboter dans l'acide sulfurique concentré. L'acide chlorhydrique étant rapidement absorbé par le méthanol, il est recommandé de prendre les précautions habituelles lors de la dissolution, par exemple en introduisant le gaz par une petite ampoule renversée dont le rebord effleure la surface du liquide. La solution méthanolique d'acide chlorhydrique peut être préparée en grandes quantités à l'avance, puisqu'elle se conserve parfaitement dans des bouteilles à bouchon de verre conservées dans l'obscurité.

Note 2: Pour contrôler l'ébullition, introduire une baguette de verre dans l'éprouvette et limiter la température du bain-marie à 90 °C.



ANNEXE XI

**DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN SOLVANTS HALOGÉNÉS
VOLATILS DANS L'HUILE D'OLIVE**

1. PRINCIPE

Analyse par chromatographie en phase gazeuse selon la technique de l'espace de tête (*head space*).

2. APPAREILLAGE

2.1. Appareil de chromatographie en phase gazeuse, équipé d'un détecteur à capture d'électrons (ECD).

2.2. Appareillage pour espace de tête (*head space*).

2.3. Colonne de chromatographie en phase gazeuse en verre de 2 mètres de long et de 2 millimètres de diamètre, phase stationnaire.

OV101 à 10 % ou équivalent, imprégnant une terre de diatomée calcinée, lavée aux acides et silanisée, de granulométrie de 80 à 100 Mesh.

2.4. Gaz vecteur et gaz auxiliaire: azote pour chromatographie en phase gazeuse, adaptée à la détection par capture d'électrons.

2.5. Flacons en verre de 10 à 15 millimètres munis d'une garniture en téflon et d'un bouchon en aluminium muni d'un office pour prélèvement par seringue.

2.6. Pinces à fermeture hermétique.

2.7. Seringue pour gaz de 0,5 à 2 millilitres.

3. RÉACTIFS

Standard: solvants halogénés volatils à un degré de pureté approprié à un usage de chromatographie en phase gazeuse.

4. PROCÉDURE D'ANALYSE

4.1. Peser exactement environ 3 grammes d'huile dans un flacon en verre (à ne pas réutiliser), boucher le flacon jusqu'à fermeture hermétique. Introduire le flacon dans un thermostat à 70 °C pendant 1 heure. Prélever avec précision au moyen de la seringue un volume de 0,2 à 0,5 millilitre de l'espace de tête. L'injecter dans la colonne de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse réglé comme suit:

— température injecteur: 150 °C,

— température colonne: 70 à 80 °C,

— température détecteur: 200 à 250 °C.

4.2. Solutions de référence. Préparer des solutions standard, en utilisant de l'huile d'olive raffinée sans trace de solvants, à des concentrations variables entre 0,05 et 1 milligramme par kilogramme et en rapport à la teneur présumée de l'échantillon. La dilution éventuelle doit être effectuée avec du pentane.

4.3. Évaluation quantitative. Faire le rapport entre les surfaces ou les hauteurs des pics de l'échantillon et de la solution standard ayant la concentration présumée la plus proche. Si l'écart relatif est supérieur à 10 %, il est nécessaire de refaire l'analyse par comparaison avec une nouvelle solution standard jusqu'à ce que sa concentration respecte l'écart relatif susmentionné. La teneur est établie sur la base d'une moyenne d'injections élémentaires.

4.4. Expression des résultats. Les résultats sont exprimés en milligrammes par kilogramme (ppm). La limite de détection de la méthode est de 0,01 milligramme par kilogramme.

▼**B**

ANNEXE XII

ÉVALUATION ORGANOLEPTIQUE DE L'HUILE D'OLIVE VIERGE

1. OBJET

La présente méthode a pour but d'établir les critères nécessaires à l'évaluation des caractéristiques de la saveur de l'huile d'olive vierge et de développer la méthodologie nécessaire.

2. DOMAINE D'APPLICATION

La méthode décrite n'est applicable qu'à l'évaluation et à la classification organoleptique de l'huile d'olive vierge utilisable pour la consommation directe. Elle se limite à classer l'huile vierge dans une échelle numérique établie en rapport avec la perception des stimuli de sa saveur, d'après le jugement d'un groupe de dégustateurs sélectionnés, constitués en jury.

3. VOCABULAIRE GÉNÉRAL DE BASE DE L'ANALYSE SENSORIELLE

Se référer au chapitre «Analyse sensorielle: vocabulaire général de base».

▼**M3**

4. VOCABULAIRE SPÉCIFIQUE POUR L'HUILE D'OLIVE

4.1. Sensations agréables, suscitées par les attributs caractéristiques de qualité des huiles d'olive vierges:

Fruité: saveur qui rappelle à la fois l'odeur et le goût du fruit sain et frais, récolté au stade optimal de maturité.

Fruité mûr: saveur de l'huile d'olive tirée de fruits mûrs, généralement d'odeur effacée et de saveur sucrée.

Fruité vert: saveur de l'huile tirée de fruits encore verts.

4.2. Sensations plus ou moins agréables en fonction de l'intensité avec laquelle elles sont perçues, qui ne sont pas à considérer comme des défauts, mais qui ont une influence sur l'harmonie du fruité:

Pomme: saveur de l'huile d'olive qui rappelle ce fruit.

Doux: saveur agréable de l'huile pas expressément sucrée, dans laquelle les attributs amers, astringents et piquants ne prédominent pas.

Herbe: saveur caractéristique de certaines huiles qui rappelle celle de l'herbe fraîchement fauchée.

Feuilles vertes (amer): saveur de l'huile obtenue d'olives trop vertes ou qui ont été broyées mélangées aux feuilles et brindilles.

Amer: goût caractéristique de l'huile obtenue d'olives vertes ou au stade de la véraison. Il peut être plus ou moins agréable en fonction de son intensité.

Âpre: sensation caractéristique chez certaines huiles dont la dégustation provoque une réaction kinesthésique bucco-tactile d'astringence.

Piquant: sensation gustative de picotement, caractéristique des huiles produites au début de la campagne, principalement à partir d'olives encore vertes. Elle est due à l'action des substances phénoliques sur les terminales du nerf trijumeau qui s'étendent sur toute la cavité buccale.

Amande: cette saveur peut revêtir deux formes différentes: l'une typique de l'amande fraîche, l'autre propre de l'amande sèche et saine qui peut être confondue avec un début de rance. Un arrière-goût tout à fait singulier est perçu lorsque l'huile demeure en contact avec la langue et le palais. Elle est associée aux huiles douces et à l'odeur éteinte.

Plat ou éteint: saveur de l'huile d'olive dont les caractéristiques organoleptiques sont très faibles par suite de la perte de leurs constituants aromatiques.

Foin: saveur caractéristique de certaines huiles qui rappelle celle de l'herbe plus ou moins desséchée.

4.3. Sensations toujours désagréables, même si leur intensité est à peine perceptible, à considérer comme des défauts organoleptiques:

▼ **M3**

Sparte: flaveur caractéristique de l'huile obtenue d'olives pressées dans des scourtins en sparte neufs. La flaveur peut être différente selon qu'il s'agisse de scourtins fabriqués à partir de sparte vert ou de sparte sec.

Terre: flaveur caractéristique de l'huile obtenue d'olives ramassées avec de la terre ou boueuses et non lavées. Dans certains cas, cette flaveur peut être accompagnée de celle de moisi.

Vieux ou renfermé: flaveur caractéristique de l'huile lorsqu'elle demeure trop longtemps dans les récipients de stockage. Elle peut également être relevée chez des huiles conditionnées pendant une période de temps trop prolongée.

Ver: flaveur caractéristique de l'huile issue d'olives ayant subi une forte attaque de larves de la mouche de l'olive (*Dacus oleae*).

Métallique: flaveur qui rappelle les métaux. Elle est caractéristique de l'huile qui est demeurée longtemps en contact avec des aliments ou des surfaces métalliques, dans des conditions impropres, au cours des processus de broyage, de malaxage, de pression ou de stockage.

Moisi-humide: flaveur caractéristique de l'huile obtenue d'olives attaquées par des moisissures et des levures par suite d'un chômage des fruits pendant plusieurs jours et dans l'humidité.

Rance: flaveur caractéristique et commune à toutes les huiles et graisses ayant subi un processus d'auto-oxydation, par suite d'un contact prolongé avec l'air. Cette flaveur est désagréable et irréversible.

Chômé: flaveur caractéristique de l'huile tirée d'olives amoncelées dans un état avancé de fermentation.

Saumure: flaveur de l'huile obtenue d'olives conservées dans des solutions salines.

Grignons: flaveur caractéristique qui rappelle celle des grignons d'olive.

Savonneux: flaveur donnant lieu à une sensation olfacto-gustative rappelant celle du savon vert.

Margines: flaveur caractéristique acquise par l'huile à la suite d'une mauvaise décantation et d'un contact prolongé avec les eaux de végétation.

Vineux-vinaigré: flaveur caractéristique de certaines huiles rappelant le vin ou le vinaigre. Cette flaveur est due fondamentalement à la formation d'acide acétique, acétate d'éthyle et éthanol, en quantités supérieures à la normale dans l'arôme de l'huile d'olive.

Concombre: flaveur de l'huile qui se produit à la suite d'un conditionnement hermétique excessivement prolongé, notamment dans des récipients en fer-blanc, et qui est attribuée à la formation de 2-6 nonadiénal.

Cuit ou brûlé: flaveur caractéristique des huiles qui tire son origine d'un réchauffement excessif et/ou prolongé au cours de son obtention et tout particulièrement pendant le thermo-malaxage de la pâte, si celui-ci est réalisé dans des conditions inappropriées.

Lies: flaveur caractéristique de l'huile récupérée des boues décantées dans les piles et réservoirs souterrains.

Scourtin: flaveur caractéristique de l'huile obtenue d'olives pressées dans des scourtins salis de résidus fermentés.

Lubrifiants: odeur de l'huile d'olive obtenue dans une huilerie dont l'équipement d'extraction n'a pas fait l'objet de l'élimination appropriée des résidus de pétrole, de graisse ou d'huile minérale.

Grossier: perception caractéristique chez certaines huiles dont la dégustation provoque une sensation bucco-tactile dense et pâteuse.

▼ **B**

5. VERRE POUR LA DÉGUSTATION DES HUILES

Se référer au chapitre «Verre pour la dégustation des huiles».

6. SALLE DE DÉGUSTATION

Se référer au chapitre «Guide pour l'installation d'une salle de dégustation».

▼B

7. USTENSILES

Chaque cabine doit être munie des ustensiles nécessaires et à la portée du dégustateur afin de lui permettre de remplir convenablement sa tâche, à savoir:

- verres (normalisés) contenant les échantillons marqués en code au niveau de deux chiffres pris au hasard, ou avec des chiffres et des lettres. Les inscriptions sont à faire au crayon indélébile et inodore,
- verres de montre, portant les mêmes inscriptions, pour couvrir les verres,
- feuille de notation (voir figure 2), complétée avec les instructions d'emploi,
- crayon ou stylo à bille,
- plateaux avec des rouelles de pomme,
- un verre d'eau à la température ambiante.

8. MÉTHODOLOGIE

Cette section établit les connaissances préalables qui s'avèrent nécessaires pour la réalisation de l'analyse sensorielle des huiles d'olive vierges et s'attache à normaliser la conduite et la façon de procéder des dégustateurs devant intervenir dans les essais, auxquels il appartiendra de prendre connaissance aussi bien des recommandations à caractère général que des recommandations spécifiques pour la dégustation des huiles d'olive.

8.1. **Rôle de l'organisateur ou responsable du jury** (ou groupe de dégustateurs)

L'organisateur du jury doit jouir d'une formation solide, tout en étant un connaisseur et un expert averti de tous les types d'huile auxquels il aura affaire au cours de son travail. Il est la clef du jury et le responsable de son organisation et de son fonctionnement. Il doit convoquer suffisamment à l'avance les dégustateurs et s'attachera à leur éclaircir tout doute susceptible de surgir quant à la réalisation des essais, tout en s'abstenant de leur suggérer des opinions, quelles qu'elles soient, sur l'échantillon.

Il est le responsable de l'inventaire des ustensiles, de leur parfait nettoyage, de la préparation et de la codification des échantillons, ainsi que de leur présentation aux dégustateurs conformément au protocole d'essai retenu, du recueil des données et de leur traitement statistique, afin d'obtenir les meilleurs résultats avec le moindre effort.

Le travail du responsable du jury requiert de l'adresse sensorielle, de la méticulosité dans la préparation des essais, de l'ordre strict pour leur exécution, ainsi que de l'habileté et de la patience pour planifier et effectuer les essais. Le responsable du jury a en outre pour mission de relever le moral des membres du groupe, en stimulant entre eux l'intérêt, la curiosité et l'esprit compétitif. Il doit éviter que son opinion soit connue et empêcher que les critères dominants de leaders éventuels ne l'emportent sur les dégustateurs restants. Il est également de son ressort de veiller à l'entraînement, à la sélection et au contrôle des dégustateurs, afin de s'assurer qu'ils se maintiennent sur un niveau d'aptitude adéquat.

8.2. **Conditions de l'essai**

8.2.1. Volume de l'échantillon

Chaque verre doit contenir 15 millilitres d'huile.

8.2.2. Température de l'essai

Les échantillons d'huile à déguster doivent être maintenus dans les verres à une température de $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Cette température a été retenue du fait qu'elle permet le plus aisément de relever des différences organoleptiques, à température normale, lorsque les huiles sont utilisées comme condiment. Une autre raison à l'appui du choix de cette valeur réside dans le fait que des températures plus basses ou plus élevées produisent une faible volatilisation des composants aromatiques ou au contraire volatils qui sont propres aux huiles chauffées.

8.2.3. Horaire des essais

Pour la dégustation des huiles, les heures de travail optimales sont celles de la matinée: il est prouvé que des périodes de perception optimale pour le goût et l'odorat existent pendant la journée.

Une période d'acuité olfacto-gustative accrue précède les repas qui sont suivis par une diminution de cette acuité.

▼B

Toutefois, ce critère ne doit pas être poussé à l'extrême, au point que la faim puisse constituer un facteur de distraction chez les dégustateurs et être à l'origine d'une réduction de leur capacité de discrimination et, notamment, de leurs critères de préférence et d'acceptation.

9. DÉGUSTATEURS

Les personnes intervenant en qualité de dégustateurs dans les essais organoleptiques d'huiles d'olive alimentaires doivent être entraînées et choisies en fonction de leur habilité à faire la distinction entre échantillons similaires; il y a lieu de ne pas perdre de vue que la précision améliore avec l'entraînement (voir section s'y rapportant).

Pour chaque essai il faut disposer de huit à douze dégustateurs. Toutefois, il convient de prévoir quelques dégustateurs supplémentaires auxquels on peut faire appel en cas d'absences éventuelles.

9.1. Règles générales de conduite à observer par les candidats et les dégustateurs

Les présentes recommandations visent le comportement devant être observé par les candidats et les dégustateurs au cours de leur travail.

Dès réception de la communication du responsable du jury l'invitant à intervenir dans un essai organoleptique, le dégustateur doit être en mesure de l'effectuer aux heures indiquées et est tenu au respect des règles ci-après.

- 9.1.1. S'abstenir de fumer pendant au moins 30 minutes avant l'heure fixée pour l'essai.
- 9.1.2. Ne pas utiliser un parfum, un cosmétique ou un savon dont l'odeur pourrait persister au moment de l'essai. Les mains doivent être lavées avec un savon non parfumé ou peu parfumé, puis rincées et séchées autant de fois que nécessaire pour éliminer toute trace d'odeur.
- 9.1.3. Ne rien manger pendant au moins une heure avant la dégustation.
- 9.1.4. Dans l'hypothèse où ses conditions physiologiques seraient affectées, notamment son sens de l'odorat ou du goût, ou s'il se trouve sous le coup d'un effet psychologique quelconque qui l'empêcherait de se concentrer, il doit prévenir le responsable du jury afin que celui-ci le retire du test ou prenne les décisions opportunes, compte tenu de la possibilité pour ce dégustateur de s'écarter des valeurs moyennes du reste des membres du jury.
- 9.1.5. Après avoir rempli les règles précitées, le dégustateur doit s'installer dans la cabine qui lui a été assignée, d'une manière aussi ordonnée et silencieuse que possible.
- 9.1.6. Une fois assis, il doit vérifier si le matériel dont il a besoin est bien rangé et en règle et si l'inscription en code de chaque verre correspond bien à celle apposée sur le verre de montre le recouvrant.
- 9.1.7. Il doit lire attentivement les instructions figurant dans la feuille de notation et ne commencer l'examen de l'échantillon que lorsqu'il se sera tout à fait identifié et familiarisé avec la tâche dont il doit s'acquitter. En cas de doute, il doit s'adresser au responsable du jury pour discuter en privé avec lui des difficultés rencontrées.
- 9.1.8. Le dégustateur doit prendre le verre, en le maintenant couvert avec le verre de montre, puis l'incliner légèrement et dans cette position il le fera tourner entièrement afin d'en mouiller le plus possible la surface intérieure. Après cette opération, il doit enlever le verre de montre et flairer l'échantillon par des inspirations suaves, lentes et intenses, pour pouvoir se faire un critère sur l'échantillon soumis à son appréciation. La durée de l'olfaction ne doit pas dépasser 30 secondes. Si pendant ce temps le dégustateur n'est parvenu à aucune conclusion, il doit faire une pause avant de procéder à une nouvelle tentative. Une fois conclu l'essai olfactif, il est procédé au jugement de la flaveur (ensemble des sensations olfacto-gustativo-tactiles). Pour ce faire, prendre une petite gorgée d'huile, de 3 millilitres environ. Il est très important de distribuer l'huile sur toute la cavité buccale, depuis la partie antérieure de la bouche et la langue, en passant par les parties latérales et la partie postérieure jusqu'au voile du palais; comme chacun sait, les quatre saveurs fondamentales (sucrée, salée, acide et amère) sont en effet perçues avec une intensité variable selon les différentes zones de la langue et du palais.

Il y a lieu d'insister sur la nécessité de répandre l'huile en quantité suffisante et très lentement sur la partie postérieure de la langue jusqu'au voile du palais et la gorge, en concentrant l'attention sur l'ordre d'apparition des

▼B

stimuli amer et piquant; s'il n'est pas procédé ainsi, chez certaines huiles ces deux stimuli peuvent passer inaperçus ou encore le stimulus amer peut être masqué par le stimulus piquant.

Des aspirations brèves et successives, en faisant pénétrer de l'air par la bouche, permettent non seulement de répandre l'échantillon sur toute la cavité buccale, mais également de percevoir par voie rétro-nasale les composants volatils aromatiques.

La sensation tactile doit aussi être prise en considération. C'est ainsi que la fluidité, l'empâtement et la démangeaison ou picotement doivent être annotés dès détection et, si l'essai l'exige, il faut en quantifier l'intensité.

- 9.1.9. L'évaluation organoleptique d'une huile d'olive vierge doit porter sur un seul échantillon par séance, dans le souci d'éviter l'effet de contraste que pourrait provoquer la dégustation immédiate d'autres échantillons.

Étant donné que les dégustations successives sont affectées par la fatigue ou par la perte d'acuité, causées par les précédentes, il importe d'utiliser un produit capable d'éliminer de la bouche les restes d'huile de la dégustation venant d'être effectuée.

Il est recommandé d'utiliser un petit morceau de pomme de quelque 15 grammes qui, après mastication, peut être jeté dans le crachoir. Par la suite, se rincer la bouche avec un peu d'eau à la température ambiante. Laisser passer au moins 15 minutes avant de procéder à la dégustation suivante.

9.2. **Présélection des candidats**

Il appartiendra au responsable du jury, moyennant des entrevues personnelles, d'opérer cette présélection qui a pour but de connaître la personnalité des candidats et les conditions qui les entourent. Pour ce qui est des conditions physiologiques et psychologiques, celles à remplir par les candidats ne sont pas très rigoureuses du fait que, en principe, toute personne normale est susceptible de déployer cette activité. Les conditions en matière d'âge, de sexe, et certaines habitudes (fumer), etc. passent de nos jours au second plan face à d'autres aspects, tels que: la santé, l'intérêt personnel et le fait d'avoir du temps disponible pour ce travail.

Lors de l'entrevue, le responsable du jury doit expliquer au candidat les caractéristiques de la fonction qu'il va assurer et lui dire combien de temps cela va à peu près l'occuper. Par la suite, le responsable du jury doit obtenir du candidat des données lui permettant d'en évaluer à la fois l'intérêt et la motivation, tout en lui demandant d'indiquer combien de temps il va pouvoir réellement consacrer à cette activité. Le questionnaire ci-après peut servir de référence.



QUESTIONNAIRE

Prière de répondre aux questions suivantes:

- | | | |
|---|---------------------------------|---------------------------------|
| | oui | non |
| 1. Aimeriez-vous collaborer aux travaux de ce thème? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Considérez-vous que ce travail peut s'avérer important pour améliorer la qualité des aliments dans votre pays et le commerce international? | oui
<input type="checkbox"/> | non
<input type="checkbox"/> |
| 3. Dans l'affirmative, en indiquer les raisons ⁽¹⁾ | | |
| | | |
| | | |
| 4. N'oubliez pas que vous serez appelé à déguster différentes huiles en tant que de besoin. Êtes-vous prêt à le faire? | oui
<input type="checkbox"/> | non
<input type="checkbox"/> |
| 5. Aimeriez-vous comparer votre habileté olfacto-gustative à celle de vos collègues? | oui
<input type="checkbox"/> | non
<input type="checkbox"/> |
| 6. Avez-vous du temps disponible? Jouissez-vous de l'indépendance suffisante pour organiser votre travail journalier? | oui
<input type="checkbox"/> | non
<input type="checkbox"/> |
| 7. Au cas où vous dépendriez d'un supérieur, croyez-vous que si, à plusieurs reprises et en jours successifs, vous étiez requis de vous absenter de votre travail habituel pendant une demi-heure au maximum, votre chef vous permettrait-il de participer à cette tâche? | oui
<input type="checkbox"/> | non
<input type="checkbox"/> |
| 8. Seriez-vous disposé à rattraper le temps que vous consacrez à l'analyse sensorielle afin de compenser les absences de votre travail habituel? | oui
<input type="checkbox"/> | non
<input type="checkbox"/> |
| 9. Considérez-vous que ce travail devrait être rémunéré? | oui
<input type="checkbox"/> | non
<input type="checkbox"/> |
| 10. Sous quelle forme? | oui
<input type="checkbox"/> | non
<input type="checkbox"/> |

(¹)

C'est sur la base des données ainsi recueillies que le responsable du jury va effectuer la présélection. Les candidats faisant preuve de peu d'intérêt pour ce genre de travail, ayant peu de temps disponible ou incapables de préciser leurs idées, seront éliminés.

9.3. Détermination du «seuil moyen» du groupe pour des «attributs caractéristiques»

Choisir soigneusement quatre huiles, de manière que chacune d'elles soit considérée comme étant représentative des attributs: chôme, vineux, rance et amer, avec une intensité aussi marquée et nette que possible.

Prélever une partie aliquote de chacune desdites huiles et préparer des échantillons à différentes concentrations (raison 2) par dilutions successives avec le support approprié jusqu'à ce que, dans les deux ou trois dernières dilutions, il ne soit plus possible de détecter de différence avec le verre contenant uniquement le support. Un dernier couple doit être formé par deux verres contenant le support.

La série doit être complétée par des verres à des concentrations supérieures, jusqu'à huit au total.

Préparer une quantité suffisante d'échantillons aux différentes concentrations afin de pouvoir remettre des séries complètes de chaque attribut à chacun des candidats.

Pour pouvoir établir le «seuil moyen» des candidats au regard de chaque attribut, il faut leur présenter un verre contenant 15 millilitres de l'une quelconque des concentrations préparées, en même temps qu'un verre contenant uniquement 15 millilitres du «support». Après avoir réalisé

(¹) Prière de préciser quel est, à votre avis, l'intérêt que peut présenter l'évaluation de tout aliment, ou encore de l'huile d'olive, sous l'angle de ses caractéristiques organoleptiques.

▼B

l'essai, le candidat doit indiquer si le contenu des verres est identique ou différent.

Le même essai doit être répété en ce qui concerne les concentrations restantes de l'attribut étudié.

Noter le nombre de réponses correctes obtenues, au regard de chaque concentration, de l'ensemble des candidats et l'exprimer en pourcentage du nombre d'essais effectués.

Représenter par ordre croissant, en abscisses, les concentrations testées et, en ordonnées, le pourcentage des identifications correctes intervenues au regard de chaque concentration.

La figure 1 donne un exemple pratique des développements qui précèdent. Le seuil de détection est défini sur abscisses en extrapolant de la courbe le point de l'ordonnée correspondant à 75 % des réponses exactes.

Cette concentration «seuil» qui peut être différente pour chaque huile de départ, car elle est fonction de l'intensité de l'attribut présent, doit être similaire pour les différents groupes de candidats de divers jurys; elle n'est tributaire d'aucune coutume, habitude ou préférence tendancieuse. Il s'agit, en conséquence, d'un point de repère commun à tout groupe humain normal et peut servir à l'homogénéisation des différents jurys seulement en raison de leur acuité olfacto-gustative.

À partir de la concentration «seuil» du groupe ainsi obtenue, procéder comme suit.

Préparer une série de concentrations croissantes et décroissantes de sorte que cette «concentration seuil» se situe à l'échelon 10 de cette échelle. Il appert que des concentrations 11 et 12 seront plus diluées et, dès lors, il sera très difficile de détecter chez elles la présence de l'huile avec l'attribut choisi.

À partir de la concentration C_{10} , les échantillons restants peuvent être préparés par application de la formule suivante:

$C_{10} \times a^n$, où: «a» est une constante qui correspond au facteur de dilution égal à 1,5 et «n» l'exposant qui varie de 9 à - 2.

Par exemple: posant que le seuil obtenu pour l'huile rance est égal à 0,32, que la C_{10} est égale à 0,32 et comme «a» est égal à 1,5, la série d'échantillons aura les concentrations suivantes:

Échantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentration	12,30	8,20	5,47	3,65	2,43	1,62	1,08	0,72	0,48	0,32	0,21	0,14

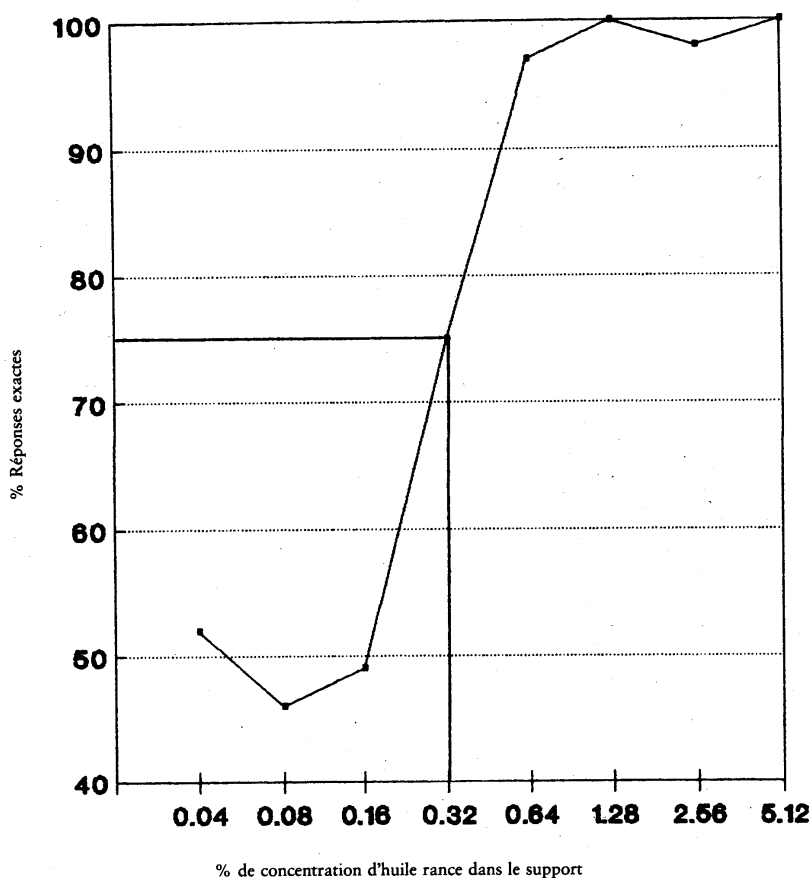
S'il est procédé de la même façon pour les trois autres attributs, l'on obtiendra, à partir des seuils respectifs calculés également comme indiqué ci-dessus, des échelles qui présenteront pour tous les laboratoires des intensités aromatiques similaires pour chaque stimulus bien que les huiles de départ aient des défauts perceptibles à des intensités différentes.

9.4. Sélection de dégustateurs par la méthode de «classification d'intensité»

La sélection doit intervenir à partir d'un nombre de candidats deux ou trois fois supérieur à celui jugé nécessaire pour la constitution de l'équipe de dégustateurs, afin de faciliter le choix des plus sensibles ou de ceux faisant preuve d'une capacité de discrimination plus poussée. Il est recommandé en tous cas de réaliser les essais avec le même produit qui fera l'objet d'analyse par la suite (au cas particulier, il y a lieu d'utiliser toujours de l'huile d'olive).

▼B

Figure 1



Pour le choix de la méthode, il y a lieu de ne pas perdre de vue, indépendamment de son efficacité, que la procédure à retenir doit être la plus économique possible quant à la quantité d'huile, au nombre d'échantillons à utiliser et au temps réservé à la sélection. L'efficacité d'une procédure de sélection se caractérise par le choix des niveaux optimaux des trois variables dépendantes ci-après: a) «coût» déterminé par le nombre d'essais; b) «proportion» de candidats potentiellement aptes, mais qui par hasard ont été malheureusement éliminés lors de la sélection et c) «proportion» de candidats non aptes mais qui, par un hasard favorable, ont été acceptés alors qu'ils n'auraient pas dû l'être.

La procédure de sélection retenue est celle décrite sous le titre de «The intensity rating test» (essai de classification d'intensité) dans les normes A.S.T.M. (American Society for Testing and Materials Publication), S.T.P. (Special Technical Publication) n° 440, page 53, modifiée sur quatre points:

- 1) réduction du nombre d'échantillons dans la série;
- 2) extension des stimuli, à l'effet d'augmenter le nombre de notations olfacto-gustatives sur lesquelles est basée la sélection, dans le souci de les adapter aux défauts les plus communs perceptibles dans l'huile d'olive;
- 3) variation de la relation de concentration dans la série;
- 4) traitement statistique des résultats.

Matériel nécessaire

- Bouteilles ou ballons de 1 500 millilitres
- Verres à dégustation de couleur foncée
- Éprouvettes de 10, 15, 1 000 et 1 500 millilitres.

Produits nécessaires

- Paraffine Merck (référence 7.160, DAB 8, USP XX) ou support huileux inodore et insipide (huile d'olive ou autre similaire, récemment raffinée)
- Huiles: chômée, vineuse, rance et amère.

▼B

9.4.1. Mode opératoire

Après avoir préparé les dilutions, passer à la sélection en commençant par vingt-cinq candidats, conformément à la méthodologie qui sera expliquée ci-après pour chaque stimulus.

- 1) Préparer des séries de douze verres à dégustation, marqués en code (une série par candidat). Verser dans chaque verre 15 millilitres de chacune des différentes concentrations, préparées d'après la formule $C_{10} \times a^n$.
- 2) Une fois remplis et couverts avec le verre de montre, les verres doivent rester dans la salle de dégustation à une température de 20 à 22 °C pendant au moins une heure avant le commencement des essais afin d'homogénéiser leur température avec la température ambiante.
- 3) Le responsable de l'essai alignera ensuite les douze verres de chaque série, par ordre décroissant de concentration.

Par la suite, chaque candidat est invité à réaliser l'essai séparément, en suivant les instructions ci-après.

9.4.2. Instructions pour le candidat

Les douze verres rangés en ligne devant le candidat contiennent des dilutions de chacun des stimuli chôme, vineux, rance ou amer, selon le cas. Les verres se distinguent les uns des autres par l'intensité de l'odeur, étant précisé que celui à l'odeur la plus intense est placé à l'extrême gauche, l'intensité de l'odeur des verres restants diminuant graduellement vers la droite. Le dernier verre à droite peut présenter une odeur tellement faible qu'il sera peut-être impossible de la détecter.

Procédez comme suit: familiarisez-vous avec les odeurs dégagées par les verres de la série. Pour ce faire, commencez par celui qui se trouve à droite (n° 12) et efforcez-vous de retenir l'intensité des odeurs, sans pour autant vous fatiguer.

À partir du moment où vous estimez que vous vous êtes habitué à l'échelle de concentration des odeurs dégagées par les verres de la série, sortez de la pièce.

Pendant ce temps, le responsable de l'essai choisira un verre de la série et le placera au même niveau que le dernier à droite (n° 12) tout en rapprochant les verres restants pour combler le vide laissé par celui qu'il a choisi. Retournez alors dans la pièce pour poursuivre l'essai.

La preuve demandée est la suivante.

Le verre qui a été choisi par le responsable de l'essai doit être replacé à sa place exacte dans la série. Pour ce faire, vous pouvez le flairer et le comparer aux verres restants autant de fois que nécessaire, étant précisé que si vous voulez le replacer à son endroit exact dans la série, vous ne devez pas oublier que l'odeur qu'il dégage doit être plus intense que celle du verre placé immédiatement à droite et moins intense que celle du verre placé immédiatement à gauche. L'essai est à répéter avec trois autres verres.

Dans le but de faciliter l'opération et le recueil des réponses, il doit être remis à chaque candidat, outre les instructions précitées, le relevé suivant.

SÉLECTION DE CANDIDATS

Essai n°: Stimulus:

Le verre séparé doit être replacé à l'endroit n°:

Date: Nom:

9.4.3. Obtention des résultats

Pour faciliter la mise en ordre des données de chacun des candidats, le responsable du jury doit les noter de la manière suivante:

▼B

Nom du candidat	Stimulus étudié	Numéro d'ordre indiqué (K')	Numéro d'ordre exact (K)	Notation (K' - K) ²
.....
.....

9.4.4. Procédure statistique de notation

Au cas particulier de la sélection effectuée, les verres qui sont à replacer à leur endroit exact doivent être les mêmes pour les candidats. Conformément aux calculs statistiques réalisés à cet effet, ces verres correspondent, dans l'ordre de la série, aux places ci-après pour chaque stimulus:

Chômé (Ch)	Vineux (Vi)	Rance (Ra)	Amer (Am)
Verre n° (10, 5, 7, 2)	Verre n° (11, 3, 8, 6)	Verre n° (7, 4, 10, 2)	Verre n° (6, 3, 11, 9)

Le numéro correspondant à la place occupée par les verres dans l'ordre de la série ne peut pas être modifié, étant donné que les calculs statistiques pour cet essai ont été réalisés en tenant compte de la probabilité que les verres indiqués soient replacés à leur endroit exact par hasard.

Néanmoins, à l'effet d'éviter de laisser filtrer des informations d'un candidat à l'autre, le responsable du jury doit veiller à:

- 1) empêcher toute communication entre les candidats. Modifier le code pour chaque candidat;
- 2) empêcher que les candidats aient connaissance de la place occupée par les verres qu'on leur a retiré,
- 3) modifier l'ordre de remise des verres, à chaque candidat, bien que ceux-ci soient les mêmes pour tous.

Chaque candidat recevra ensuite une notation en fonction des résultats qu'il aura obtenus. Pour ce faire, procéder comme suit:

Désigner par e^1, e^2, \dots, e^{12} les douze verres contenant les douze concentrations correspondantes d'un stimulus «i» (i = n'importe lequel des quatre stimuli: chômé, vineux, rance et amer) alignés par ordre décroissant de l'intensité du stimulus considéré.

Désigner par e^k un des verres choisis et par K' la position que le candidat aura assignée au verre au moment de le replacer dans la série. Les valeurs de K et K' sont, en conséquence, des nombres entiers compris entre 1 et 12 inclus, qui correspondent aux positions réelle et assignée par le candidat, respectivement.

Désigner par T (écart maximal admis) une valeur, fixée au préalable, dans notre cas égale à 3, de manière, que si $(K' - K) > T$, le candidat soit automatiquement éliminé⁽¹⁾.

Par contre, si $(K' - K) \leq T$, le candidat, en principe, n'est pas éliminé et peut, dès lors, poursuivre l'essai, du fait qu'il s'est révélé capable de replacer le stimulus considéré à sa place exacte ou tout au moins aux endroits immédiats les plus proches.

Dans ce cas, la notation assignée à un candidat lorsqu'il évalue un stimulus (concentration) déterminé, par exemple de la série «chôme» (Ch), est égale au carré de la différence entre le numéro d'ordre qui correspond à la place exacte occupée par le verre dans la série et celle à laquelle il a été replacé par le candidat, à savoir:

$$P_h^{(Ch)} = (K' - K)^2$$

Étant donné que cette opération doit être réalisée par chaque candidat sur quatre concentrations de la série de chaque stimulus, la notation partielle pour ledit stimulus (Ch par exemple) serait la suivante:

⁽¹⁾ Le responsable du jury voudra bien insister auprès du candidat afin que l'essai se réalise raisonnablement, c'est-à-dire sans qu'il y ait perte d'acuité par fatigue olfactive.

▼B

$$Z^{\text{Ch}} = P_h^{\text{Ch}} + P_j^{\text{Ch}} + P_l^{\text{Ch}} + P_m^{\text{Ch}}$$

Dans un souci de meilleure compréhension, voici les exemples ci-après:

Exemple n° 1:

Supposons que les réponses du candidat A, en ce qui concerne les quatre concentrations du stimulus (i) qui ont été retirées de la série, sont les suivantes:

Place exacte du verre dans la série (K)	Place à laquelle le verre a été rangé par le candidat (K')	Écart de la place exacte (K' - K)
7	7	7 - 7 = 0
4	5	4 - 5 = - 1
10	6	10 - 6 = 4 (¹)
2	4	2 - 4 = - 2

(¹) Ce candidat est éliminé, du fait que sa valeur T est supérieure à 3.

Exemple n° 2:

Supposons qu'un autre candidat replace les quatre concentrations du stimulus considéré comme suit:

Place exacte du verre dans la série (K)	Place à laquelle le verre a été rangé par le candidat (K')	Écart de la place exacte (K' - K)
7	7	7 - 7 = 0
4	4	4 - 4 = - 0
10	7	10 - 7 = 3
2	3	2 - 3 = - 1

Ce candidat n'est pas éliminé, la notation qui lui est assignée au regard de ce stimulus étant:

$$Z^i = 0^2 + 0^2 + 3^2 + (-1)^2 = 10$$

La notation finale du candidat aux fins de sa sélection ou non en tant que dégustateur en fonction de ses réponses au regard des quatre stimuli considérés se présente comme suit:

$$P_h^{\text{Ch}} + P_j^{\text{Ch}} + P_l^{\text{Ch}} + P_m^{\text{Ch}} = Z^{\text{Ch}}$$

$$P_h^{\text{Vi}} + P_j^{\text{Vi}} + P_l^{\text{Vi}} + P_m^{\text{Vi}} = Z^{\text{Vi}}$$

$$P_h^{\text{Ra}} + P_j^{\text{Ra}} + P_l^{\text{Ra}} + P_m^{\text{Ra}} = Z^{\text{Ra}}$$

$$P_h^{\text{Am}} + P_j^{\text{Am}} + P_l^{\text{Am}} + P_m^{\text{Am}} = Z^{\text{Am}}$$

$$Z \text{ final} = Z^{\text{Ch}} + \dots + Z^{\text{Am}}$$

où:

Ch: = Chômé;

Vi: = Vieux;

Ra: = Rance;

Am: = Amer.

Il s'agit maintenant de déterminer jusqu'à quelle valeur maximale de Z il est possible de considérer que le candidat possède de bons niveaux de perception, de mémoire olfactive et d'organisation mentale pour donner la réponse appropriée au regard des quatre stimuli considérés. De toute évidence, Z est toujours une valeur non négative et Z = 0 signifie que le candidat a reconnu et quantifié correctement l'ensemble des seize intensités qui lui ont été présentées (quatre pour chaque stimulus). Des valeurs de Z distinctes de 0 indiquent que le candidat a reconnu les zones des échelles où se situent les intensités choisies, mais que, à l'intérieur de ces zones, il n'a pas été en mesure de replacer le stimulus à sa place exacte du fait qu'il ne possède pas une bonne capacité de discrimi-

▼B

nation, associés à la gamme d'intensité qui lui a été présentée pour un ou plusieurs des stimuli considérés.

Ainsi donc, il y aura lieu de déterminer une valeur critique Z telle que, dans l'hypothèse où le candidat replacerait tous les verres au hasard à l'intérieur des zones qu'il avait reconnues auparavant, la probabilité d'une notation définitive Z , inférieure à Z_c , soit une quantité suffisamment petite (α) qui peut être fixée au préalable. En d'autres termes, il faut s'assurer que la probabilité, par ce procédé, de sélectionner un dégustateur pour le jury ne réunissant pas des conditions de discrimination suffisantes pour les intensités des stimuli utilisés aux fins de la sélection soit inférieure à α .

Une fois fixée la valeur de α (dans notre cas = 0,05), l'obtention de Z_c dépend de la distribution de probabilité de la variable Z , celle-ci dépendant à son tour des distributions de probabilité des variables p (K').

Après avoir effectué les calculs statistiques correspondants, la valeur obtenue pour Z_c est égale à 34.

Dès que la notation Z est obtenue pour tous les candidats, ceux dont la notation est supérieure à 34 doivent être éliminés.

Voir, à titre d'exemple, les notations des candidats A et B:

Stimulus	Candidat A	Candidat B
Chômé (Ch)	$Z^{Ch} = 10$	$Z^{Ch} = 12$
Vineux (Vi)	$Z^{Vi} = 10$	$Z^{Vi} = 11$
Rance (Ra)	$Z^{Ra} = 10$	$Z^{Ra} = 15$
Amer (Am)	$Z^{Am} = 4$	$Z^{Am} = 0$
	$\Sigma = 34$	$\Sigma = 38$

Les valeurs de Z pour les deux candidats considérés étant de 34 et de 38 respectivement, le candidat A sera retenu, alors que le candidat B sera éliminé. Après avoir éliminé tous les candidats ayant obtenu une notation supérieure à 34, les restants sont classés en fonction de leurs valeurs Z jusqu'à compléter l'équipe de douze candidats que nous souhaitons réunir.

9.5. Entraînement

L'entraînement a pour objectif fondamental:

- a) de familiariser les dégustateurs avec les multiples variantes olfacto-gustativo-tactiles qu'offrent les huiles d'olive vierges;
 - b) de familiariser les dégustateurs avec la méthodologie sensorielle spécifique;
 - c) d'accroître l'habileté individuelle pour reconnaître, identifier et quantifier les stimuli sensoriels
- et
- d) d'améliorer l'acuité et la mémoire eu égard aux différents stimuli considérés, afin d'aboutir à des jugements consistants.

La période d'entraînement consiste d'habitude en une série de séances, suivant les possibilités de l'équipe et de l'étude, au cours desquelles, après avoir analysé individuellement les huiles, les dégustateurs discutent ensemble avec le responsable du jury les difficultés rencontrées, et commentent les qualifications en vue d'unifier les critères et les opinions.

Le niveau d'entraînement atteint après un nombre donné de séance est évalué en relevant l'augmentation du pourcentage de réponses exactes, au cas où on utiliserait des essais de discrimination, ou en analysant les variances des qualifications individuelles moyennes du groupe, lorsqu'il s'agit d'essais à l'aide d'une échelle.

L'utilité pratique de cette période d'entraînement a été amplement discutée, mais actuellement elle est considérée très efficace et même indispensable si on veut disposer de données sensorielles exactes et précises.

▼B9.6. **Contrôle**

Les équipes de dégustateurs vétérans réalisent d'habitude des dégustations régulières et suivies avec des preuves sensorielles qui exigent de gros efforts de leur part. Des décisions revêtant une grande importance technologique et commerciale dépendent, bien des fois, de leur jugement et c'est ainsi qu'après avoir été sélectionnés et bien entraînés, les dégustateurs doivent être soumis à des contrôles devant garantir la fiabilité des résultats.

De toute évidence, il serait nécessaire, après avoir constitué les jurys et les avoir soumis à des essais de routine, de contrôler régulièrement leur «performance» à des intervalles appropriés.

10. **PROCÉDURE À SUIVRE POUR L'ÉVALUATION ORGANOLEPTIQUE DE L'HUILE D'OLIVE VIERGE**

Dès accomplissement des conditions indiquées dans les normes précitées, disponibilité des moyens nécessaires et sélection du groupe de dégustateurs, chacun d'eux doit sentir, puis déguster⁽¹⁾ l'huile soumise à examen, contenue dans le verre à dégustation, afin d'en analyser les perceptions olfactives, gustatives, tactiles et kinesthésiques à l'aide de la feuille faisant l'objet de la figure 2, sur laquelle il doit noter leur présence et la valeur qu'il attribue à leur intensité. Par la suite, il doit passer à la phase de notation de la qualité de l'huile.

10.1. **Utilisation de la feuille de la figure 2** (description de la flaveur et notation de la qualité)

Sur la partie gauche de cette feuille sont portées quelques-unes des perceptions sensorielles les plus caractéristiques que l'on retrouve le plus souvent chez les huiles d'olive et qui en décrivent la flaveur. Au cas où l'on percevrait d'autres stimuli ne correspondant pas aux qualificatifs énumérés, le dégustateur doit les noter sous la rubrique «autres» en employant le ou les qualificatifs les décrivant avec le plus de précision.

Les stimuli perceptibles doivent être évalués proportionnellement à leur intensité par l'indication d'un signe (+) dans la case correspondante, conformément au critère suivant:

- 1 = à peine perceptible
- 2 = léger
- 3 = moyen
- 4 = grand
- 5 = extrême

Sur la partie droite de cette feuille est portée une échelle allant de 1 à 9 points (9 pour la qualité exceptionnelle et 1 pour la pire), qui doit être utilisée par le dégustateur pour donner une notation unique, d'ensemble, aux caractéristiques de l'huile. Cette notation unique, d'ensemble, aux caractéristiques de l'huile. Cette notation doit être en accord avec les vertus, les défauts repérés dans l'huile et déjà relevés dans la partie gauche de la feuille.

La première colonne (défauts) de la table de notation comporte cinq rubriques, dès lors, la classification des huiles doit être basée essentiellement sur l'absence totale ou la présence de flaveurs defectueuses, ainsi que sur la plus ou moins grande gravité ou intensité des défauts. Toutefois, l'échelle d'évaluation étant de 9 points, il y a lieu de tenir compte de certaines nuances ou de certains aspects, décrits dans la deuxième colonne «caractéristiques», qui contribuent de manière définitive à prendre une décision sur la notation totale de qualité.

10.2. **Notation finale**

Le responsable du jury doit recueillir les fiches remplies par chaque dégustateur, pour vérifier que les attributs sensoriels et les intensités avec lesquelles il les a perçus et notés dans la «feuille du profil» concordent avec l'évaluation attribuée à l'huile dans la «table de notation». En cas de différence sensible, le responsable doit demander au dégustateur de réviser sa feuille de notation.

Si nécessaire, le dégustateur doit répéter l'essai.

⁽¹⁾ Il pourra s'en abstenir quand il observera quelque attribut extrêmement et intensément désagréable, et notera sur la feuille de notation cette circonstance exceptionnelle.

▼B

Enfin, le responsable du jury doit procéder à la mise en tableau des notations de l'ensemble du groupe et au calcul de la moyenne arithmétique et de l'erreur-type (de la moyenne) en résultant.

Si l'erreur-type est supérieure à l'erreur de la méthode, il doit faire répéter l'essai à l'ensemble du groupe.

Seul dans le cas d'une analyse de révision, le groupe doit répéter les essais jusqu'à obtenir trois évaluations par échantillon. La notation finale est la résultante de la moyenne des trois notations données, avec un chiffre décimal.

Si la valeur de l'intensité moyenne de l'amer et/ou piquant est supérieure à 2,5, il faut donner à l'huile la notation correspondante, tout en ajoutant qu'elle est particulièrement amère et/ou piquante.

▼M5

Expression des résultats: le responsable du jury, sur la base de la notation moyenne, détermine la catégorie dans laquelle l'échantillon est classé, conformément aux limites prévues à l'annexe I. À cette fin, le responsable du jury applique:

- pendant la campagne 1992/1993, une tolérance de + 1,5,
- pendant la campagne 1993/1994, une tolérance de + 1,
- pendant la campagne 1994/1995, une tolérance de + 0,5

si la notation moyenne est égale ou supérieure à 5 points.

Toutefois, pour les huiles faisant l'objet d'opérations liées à l'intervention, la tolérance est limitée, au cours des campagnes précitées, à + 0,5.

La différence statistique, relative aux valeurs de répétabilité et de reproductibilité de la méthode, entre le résultat de l'analyse et la limite réglementaire est comprise dans la tolérance visée aux alinéas précédents.

Dans le cas où, pendant les campagnes précitées, l'intéressé procède au classement de l'huile sans appliquer la tolérance prévue, il peut indiquer sur l'emballage immédiat la notation organoleptique minimale du produit, vérifiable pendant la période de commercialisation.

Le responsable du jury n'indique dans le rapport d'analyse que la catégorie dans laquelle l'échantillon est classé. Dans le cas d'examen effectué par l'analyste conformément à l'article 2 paragraphe 2 premier alinéa, celui-ci applique la même procédure de détermination de la catégorie.

▼B

Note: Les échantillons doivent être conservés en récipients fermés et au réfrigérateur jusqu'au moment de leur analyse et doivent y être replacés jusqu'à compléter les trois évaluations.

▼ **M3**

Figure 2
Huile d'olive vierge

Feuille du profil
Notes olfacto-gustativo-tactiles

	Intensité de perception (°)					
	0	1	2	3	4	5
Fruité d'olive (mûre et verte) (°)						
Pomme						
Autre(s) fruit(s) mûr(s)						
Vert (feuille, herbe)						
Amer						
Piquant						
Doux						
Autre(s) attribut(s) tolérable(s) Le ou Lesquels ?						
.....						
Aigre/Vineux/Vinaigré/Acide (°)						
Grossier						
Métallique						
Moisi						
Lies						
Chômé						
Rance						
Autre(s) attribut(s) intolérable(s) Le ou lesquels ?						
.....						

(°) Intensité de la perception :

- 0 = Absence totale (°)
- 1 = À peine perceptible,
- 2 = Légère,
- 3 = Moyenne,
- 4 = Grande,
- 5 = Extrême.

(°) Biffer la mention inutile.

(°) Il est obligatoire d'indiquer l'absence de la perception sensorielle correspondante par une croix dans la case.

Table de notation

Défauts	Caractéristiques	Évaluation globale points
Aucun	Fruité d'olive	9
	Fruité d'olive et d'autres fruits frais	8
		7
À peine perçus	Fruité éteint, quel qu'il soit	6
Perçus légèrement	Fruité quelque peu défectueux, odeurs et saveurs anormales	5
Perçus avec une intensité moyenne	Nettement défectueux, odeurs et saveurs désagréables	4
Perçus nettement et avec une intensité extrême	Odeurs et saveurs tout à fait inadmissibles pour la consommation	3
		2
		1

Observations :

.....

Nom du dégustateur :

.....

Code de l'échantillon :

Date :

▼ **B**

ANALYSE SENSORIELLE: VOCABULAIRE GÉNÉRAL DE BASE

1. OBJET

La présente norme a pour objet de regrouper les termes généraux utilisés pour l'analyse sensorielle et de fournir leur définition.

2. VOCABULAIRE

2.1. Terminologie générale

Analyse sensorielle (subst.):

▼B

examen des propriétés organoleptiques d'un produit par les organes des sens.

Perception (subst.):

prise de connaissance sensorielle d'objets ou d'événements extérieurs.

Organoleptique (adj.) (caractère ou propriété):

qualifie toute propriété d'un produit perceptible par les organes des sens.

Expert (subst.):

(en ce qui concerne l'examen des caractères organoleptiques)

dégustateur spécialisé dans l'analyse sensorielle d'un produit déterminé et ayant des connaissances fondamentales en matière d'élaboration dudit produit et des préférences du marché.

Dégustateur (subst.):

personne perspicace, sensible, sélectionnée et entraînée qui évalue les caractères organoleptiques d'un produit alimentaire avec les organes des sens.

Jury (subst.):

groupe de dégustateurs ayant fait l'objet d'une sélection et d'un entraînement spéciaux, qui se réunissent pour effectuer, sous des conditions contrôlées, l'analyse sensorielle du produit.

Sensation (subst.):

phénomène subjectif résultat du stimulus d'un système sensoriel. Ce phénomène est subjectivement discriminable ou objectivement définissable au moyen de l'organe sensoriel considéré, en fonction de la nature ou de la qualité du stimulus, ainsi que de son intensité.

Acuité (subst.):

aptitude des organes sensoriels à percevoir qualitativement et quantitativement un stimulus de faible intensité ou des différences légères entre stimuli.

En français, ce terme doit être distingué du terme «sensibilité» qui ne fait pas référence au niveau d'aptitude.

Dégustation (subst.):

opération qui consiste à percevoir, analyser et juger les caractères organoleptiques et, plus particulièrement, les caractères olfactogustatifs, tactiles et kinesthésiques d'un produit alimentaire.

Acceptation (subst.):

acte consistant, pour un individu ou une population, à recevoir favorablement un produit.

Harmonie (subst.):

qualité d'un produit qui provoque une sensation d'ensemble agréable. Cette sensation est due à la perception des constituants du produit en tant que stimuli olfactogustatifs, tactiles et kinesthésiques et ce, en raison de leurs rapports de concentration appropriés.

Acceptabilité (subst.):

état d'un produit reçu favorablement par un individu ou une population, en fonction de ses propriétés organoleptiques.

Discrimination (subst.):

différenciation qualitative et/ou quantitative entre deux ou plusieurs stimuli.

Compensation (subst.):

résultat de l'interaction consécutive à un ensemble de stimuli de manière que chacun d'eux est perçu moins intensément que s'il agissait isolément.

Aspect (subst.):

ensemble des caractères organoleptiques perçus par l'organe de la vue: taille, forme, couleur, conformation, turbidité, limpidité, fluidité, mousse et effervescence.

Ce terme est à utiliser de préférence à «apparence».

▼B

Attribut (subst.):

propriété caractéristique perceptible.

2.2. Terminologie relative à la physiologie

Stimulus (subst.):

agent physique ou chimique qui produit spécifiquement la réponse des récepteurs sensoriels externes ou internes. (Pl.: stimuli ou stimulus).

Goût (subst.):

(sens du goût)

sens dont les récepteurs ont leur siège dans la bouche, notamment sur la langue, et qui sont activés par différents composés en solution.

Gustatif (adj.):

qualifie la propriété d'un produit capable de stimuler l'appareil gustatif en éveillant les sensations correspondant à une ou plusieurs des quatre saveurs fondamentales: sucrée, salée, acide et amère.

Récepteur (subst.):

structure spécialisée d'un organe sensoriel excitable, capable de recevoir un stimulus et de la convertir en influx nerveux.

Note: Les récepteurs sont classés d'après le type d'énergie associée au stimulus (lumière, chaleur, son, etc.).

Olfaction (subst.):

fonction de l'organe olfactif, en vue de la perception et de la discrimination des molécules qui y accèdent, en phase gazeuse depuis l'extérieur, par voie nasale directe ou indirecte.

Intensité (subst.):

degré d'énergie d'une qualité mesurable à l'aide d'une échelle quantitative de valeurs supérieures au seuil.

Adaptation sensorielle (subst.):

modification temporaire de l'acuité pour percevoir des stimuli sensoriels, à la suite d'une exposition continue et répétée au même stimulus ou à un stimulus similaire.

Inhibition (subst.):

manque de réponse d'un organe sensoriel ou d'une partie dudit organe, malgré le fait, qu'il soit soumis à l'action d'un stimulus approprié ayant une intensité supérieure au seuil.

Réponse (subst.):

action par laquelle les cellules sensorielles répondent à celle d'un ou de plusieurs stimuli relatifs à une modalité sensorielle définie.

Corps (subst.):

sensation tactile perçue dans la bouche et qui confère un degré de densité, de viscosité, de consistance ou de compacité à un produit alimentaire.

Fragrance (subst.):

odeur fraîche, suave et délicieuse.

Sentir (verbe):

(sens actif appliqué à l'odorat). Désigne l'action de percevoir une odeur. Synonyme *odor* (en français, le verbe *odor*, bien que peu usité, peut être considéré comme synonyme).

Objectif (adj.):

- a) qualifie la sensation provoquée par la représentation réelle et vérifiable de l'objet, en réduisant au minimum les facteurs humains (tels par exemple, la préférence, l'habitude, l'affectivité);
- b) qualifie la technique qui, moyennant des méthodes sensorielles ou instrumentales, permet de réduire au minimum les erreurs personnelles.

Note: L'emploi, comme synonyme, du terme «instrumental» n'est pas recommandé.

▼B

Subjectif (adj.):

qualifie la sensation provoquée par une perception, conditionnée par la pensée ou les sentiments de chacun, et pas seulement par le stimulus.

Kinesthésie:

ensemble de sensations résultant d'une pression appliquée à l'échantillon par un mouvement dans la cavité buccale ou avec les doigts (par exemple, pression des doigts dans le cas d'un fromage).

Seuil (subst.):

Seuil absolu:

valeur minimale d'un stimulus sensoriel, nécessaire:

— à l'éveil d'une sensation (seuil d'apparition ou de détection),

ou

— à la reconnaissance de la sensation perçue (seuil d'identification).

Seuil différentiel:

valeur minimale d'un stimulus sensoriel donnant lieu à une différence perceptible dans l'intensité de la sensation.

Seuil final:

valeur maximale d'un stimulus au-dessus de laquelle il n'y a plus de différence perceptible dans l'intensité de la sensation.

Seuil préférentiel:

valeur quantitative minimale d'un stimulus ou valeur critique supra-liminaire de ce stimulus correspondant à l'apparition d'une réponse d'attraction ou de rejet par rapport à un stimulus neutre, par exemple, dans le choix entre une solution sucrée et l'eau.

Note: Il faut faire la distinction entre seuil absolu de préférence et seuil différentiel de préférence.

Infra-liminaire (adj.):

qualifie un stimulus se situant au-dessous du seuil absolu.

Supra-liminaire (adj.):

qualifie un stimulus se situant au-dessus du seuil absolu.

Fatigue sensorielle:

forme de l'adaptation sensorielle correspondant à une diminution d'acuité.

Compensation (subst.):

résultat de l'interaction consécutive à un ensemble de stimuli de manière à ce que chacun d'eux soit perçu moins intensément que s'il agissait isolément.

Synergique (adj.):

effet ou action conjuguée de substances déterminées, de manière à ce que l'intensité des caractères organoleptiques résultant de leur association soit supérieure à celle qui est attendue de la simple addition des intensités de chacun d'eux pris isolément.

Effet de contraste:

augmentation de la réponse aux différences entre deux stimuli simultanés ou consécutifs.

Contraire de l'effet de convergence.

Effet de convergence:

diminution de la réponse aux différences entre deux stimuli simultanés ou consécutifs.

Contraire de l'effet de contraste.

2.3. Terminologie relative aux propriétés organoleptiques

Acide (adj.):

a) qualifie la saveur élémentaire provoquée par des solutions aqueuses diluées de la plupart des acides (par exemple, acides citrique, lactique et tartrique);

▼B

- b) qualifie la propriété des corps purs ou mélanges dont la dégustation provoque cette saveur.

Le substantif correspondant est acidité.

Aigre (adj.):

qualifie la sensation olfactogustative, avec prédominance d'acides généralement d'origine fermentative, ainsi que les produits alimentaires qui produisent cette sensation.

Certains facteurs contribuant à cette sensation sont liés au processus de fermentation, par exemple acétique ou lactique, d'un produit alimentaire.

Amère (saveur) (adj.):

- a) qualifie la saveur élémentaire provoquée par des solutions aqueuses diluées de diverses substances, telles que la quinine, la caféine et des hétérosides déterminés;
- b) qualifie la propriété des corps purs et mélanges dont la dégustation provoque cette saveur.

Le substantif correspondant est amertume.

Salée (saveur) (adj.):

- a) sensation caractéristique perçue à travers le sens du goût; celle provoquée par une solution de chlorure de sodium en est l'exemple le plus typique;
- b) qualifie la propriété des corps purs ou mélanges dont la dégustation provoque cette saveur.

Le substantif correspondant est salinité.

Sucrée (saveur) (adj.):

- a) qualifie la saveur élémentaire provoquée par les solutions aqueuses de diverses substances telles que le saccharose;
- b) qualifie la propriété des corps purs ou mélanges dont la dégustation provoque cette saveur.

Le substantif correspondant est sucrosité.

Astringente (saveur) (adj.):

- a) qualifie la sensation complexe produite dans la bouche par une solution aqueuse diluée de produits tels que certains tannins (par exemple, les tannins du kaki et de la prunelle);
- b) qualifie la propriété des corps purs ou mélanges qui produisent cette sensation.

Le substantif correspondant est astringence.

Flaveur (subst.):

on entend par flaveur l'ensemble des perceptions des stimuli olfactogustatifs, tactiles et kinesthésiques permettant à un sujet d'identifier un produit alimentaire et d'établir un critère, à différents niveaux, favorable ou défavorable sur ledit produit.

Saveur (subst.):

- a) sensations perçues par les papilles gustatives lorsqu'elles sont stimulées par certaines substances solubles;
- b) qualité de la sensation particulière produite par ces substances.

Saveur élémentaire (subst.):

chacune des quatre saveurs reconnues: sucrée, salée, acide, amère.

Odeur (subst.):

- a) ensemble des sensations perçues par l'organe olfactif en inspirant certaines substances volatiles;
- b) qualité de la sensation particulière produite par chacune des substances précitées.

Arôme (subst.):

- a) sensations agréables perçues par l'organe olfactif par voie indirecte lors de la dégustation d'un produit alimentaire;
- b) en parfumerie et dans le langage ordinaire ce terme est appliqué également aux mêmes sensations perçues par voie nasale directe.

▼B

Arrière-goût (subst.):

ensemble des sensations perçues après disparition du stimulus de la bouche et qui diffèrent de celles perçues préalablement.

Aromatique (adj.):

- a) qualifie la propriété des corps purs ou mélanges dont la dégustation produit les sensations qualifiées par «arôme»;
- b) qualifie les produits alimentaires dont l'examen par voie nasale directe produit les sensations de fragrance et de fraîcheur.

Texture (subst.):

ensemble des caractéristiques de l'état solide ou rhéologique d'un produit alimentaire capable de stimuler les mécanorécepteurs, lors de la dégustation, et notamment ceux situés dans la région buccale.

Note: Ce terme s'applique uniquement aux propriétés objectives et non aux sensations produites et qui sont désignées par des termes généraux, telles que consistance, fibrosité, onctuosité, etc.

«*Paladear*» (savourer ou déguster dans la bouche) (verbe):

action tendant à ce qu'un produit alimentaire situé dans la bouche entre en contact avec toutes ses zones sensibles dans le but de percevoir les sensations buccales qu'il provoque.

Note: Ce vocabulaire peut être enrichi en consultant les Normes ISO 5492, parties I à V, et d'autres ouvrages, tel celui élaboré par J.L. Magnen *Les cahiers techniques du Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation*, etc.

VERRE POUR LA DÉGUSTATION DES HUILES

1. OBJET

La présente norme a pour but de décrire les caractéristiques du verre destiné à l'analyse organoleptique des huiles comestibles (odeur, saveur, flaveur).

Elle décrit, en outre, le dispositif de chauffage adapté, nécessaire pour l'obtention et le maintien de la température adéquate pour cette analyse.

2. DESCRIPTION DU VERRE

Le croquis de la figure 1 a été dessiné dans le but d'optimiser les caractéristiques souhaitables d'un ustensile de cette nature et dont les aspects fondamentaux sont précisés ci-après:

- a) stabilité maximale, évitant le balancement du verre et le renversement de l'huile y contenue;
- b) forme facilement adaptable aux cavités d'un bloc de chauffage permettant un chauffage uniforme de la base du verre;
- c) rétrécissement de la bouche favorisant la concentration des odeurs et en facilitant l'identification;
- d) en verre foncé, de façon à ce que le dégustateur ne puisse pas apprécier la couleur de l'huile, ce qui élimine tout préjugé et la possibilité de prendre des biais susceptibles de nuire à l'objectivité de la détermination.

2.1. Dimensions

Le croquis du verre fait l'objet de la figure 1, avec les dimensions suivantes:

— capacité totale	130 ml ± 10 ml,
— hauteur totale	60 mm ± 1mm,
— diamètre de la bouche	50 mm ± 1mm,
— diamètre de la partie la plus large	70 mm ± 1mm,
— diamètre de la base	35 mm ± 1 mm,
— épaisseur des parois latérales du verre	1,5 mm ± 0,2 mm,
— épaisseur du fond de verre	5 mm ± 1 mm.

▼B

Chaque verre doit être accompagné d'un verre de montre au diamètre dépassant de près de 10 millimètres celui de la bouche. Ce verre servira de couvercle pour éviter la perte d'arôme et l'entrée de poussière.

2.2. **Caractéristiques de fabrication**

Le verre doit être fabriqué en verre résistant, de couleur foncée pour empêcher l'appréciation de la couleur du contenu, et exempt de rayures et de bulles.

Le bord doit être régulier, lisse et à rebord.

Le verre doit être en verre recuit, pour lui permettre de résister aux variations de température qu'il a à subir au cours des essais.

2.3. **Règles d'emploi**

Le nettoyage des verres doit se faire en se servant de savon ou de détergent non parfumé et être suivi de plusieurs rinçages jusqu'à élimination totale du produit employé. Enfin, ils doivent être rincés à l'eau distillée, puis, après égouttage, séchés dans une étuve de dessiccation.

Il ne faut pas utiliser des acides concentrés ni des mélanges à l'acide chromique.

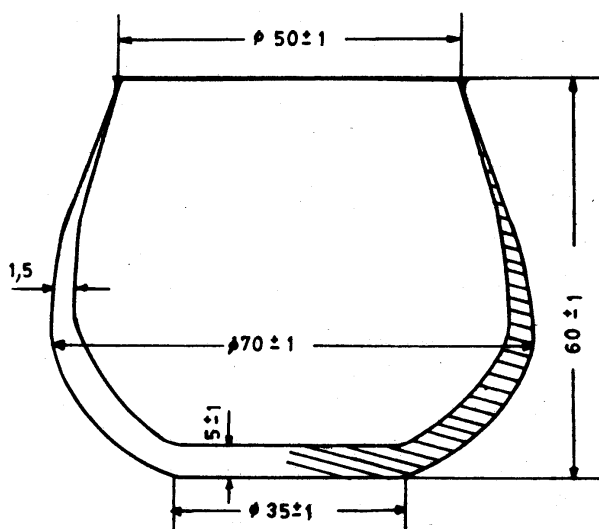
Les verres doivent être gardés dans l'étuve jusqu'à utilisation, ou bien conservés dans une armoire en les protégeant contre toute contamination d'odeurs anormales.

Avant chaque utilisation, il faut s'assurer par olfaction que les verres sont exempts d'odeurs anormales. Lors de la préparation de l'essai, veiller à noter le code de chaque verre et de l'huile correspondante. Cette correspondance du code et de l'huile ne sera connue que du responsable de l'essai.

3. **DISPOSITIF DE CHAUFFAGE DES ÉCHANTILLONS**

L'examen organoleptique des échantillons doit se faire à une température donnée qui se situe, pour les huiles alimentaires, à 28 ± 2 °C. Pour y parvenir, il faut installer à l'intérieur de chaque cabine, à la portée du dégustateur, un dispositif de chauffage (voir figure 2). Ce dispositif consiste en un bloc d'aluminium submergé dans un bain d'eau réglée au thermostat, à l'effet d'obtenir une température uniforme. Ce bloc comporte une série de cavités pour y adapter le fond des verres. La différence de température entre le dispositif de chauffage et l'huile contenue dans les verres disposés dans les cavités des différents blocs ne doit pas être supérieure à ± 2 °C.

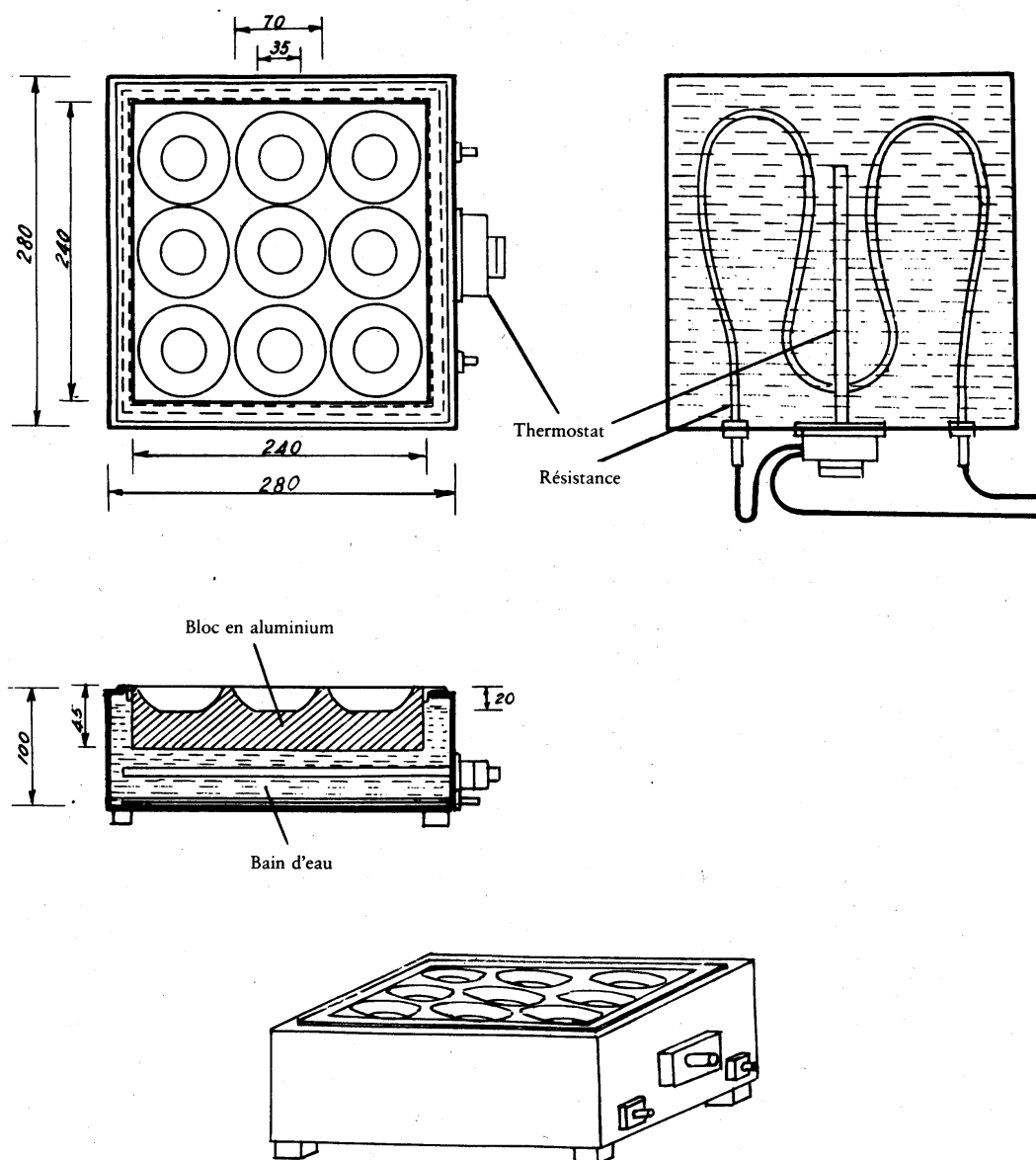
Figure 1 — Verre à dégustation



(Dimensions en millimètres)

▼B

Figure 2 — Dispositif de chauffage des échantillons



GUIDE POUR L'INSTALLATION D'UNE SALLE DE DÉGUSTATION

1. INTRODUCTION

La salle de dégustation a pour but de procurer au groupe de dégustateurs intervenant dans les essais sensoriels un milieu approprié, confortable et normalisé qui puisse faciliter leur travail et contribuer à améliorer la répétabilité et la reproductibilité des résultats.

2. OBJET

La présente norme a pour but de préciser les conditions essentielles dont il y a lieu de tenir compte pour l'aménagement d'une salle de dégustation.

3. SPÉCIFICATIONS GÉNÉRALES POUR L'INSTALLATION

Toute pièce, quelle que soit sa superficie (voir point 3.1), doit réunir les spécifications suivantes.

▼B

La pièce doit être agréable et convenablement éclairée (voir point 3.2), tout en conservant un aspect neutre. Dans ce but, il est recommandé d'utiliser pour les parois de l'uni de teinte relaxante et claire, de manière à créer une atmosphère détendue ⁽¹⁾.

La pièce doit pouvoir être nettoyée aisément. En outre, elle doit être à l'écart de toute source de bruit; partant, elle sera, de préférence, insonorisée. De même, elle doit être à l'écart de toutes odeurs anormales, raison pour laquelle il faut, si possible, la doter d'un dispositif efficace de ventilation. En cas de fluctuations sensibles de la température ambiante, la salle de dégustation doit être munie d'une installation d'air conditionné, afin d'y maintenir la température aux alentours de 20-22 °C.

3.1. Dimensions

Les dimensions de la pièce dépendent souvent des possibilités des laboratoires ou des entreprises. En général, la pièce doit être suffisamment spacieuse pour permettre l'installation d'environ dix cabines, ainsi que d'une zone pour la préparation des échantillons.

De toute évidence, il serait préférable que l'espace réservé aux installations soit plus grand, car on pourrait ainsi prévoir des dépendances annexes pour, par exemple, nettoyer le matériel, ranger des mets, ainsi que pour les réunions en «jury ouvert».

3.2. Éclairage

L'éclairage général, qu'il soit assuré par la lumière solaire ou par des lampes (par exemple, des tubes type «lumière du jour») doit être uniforme, réglable et avec lumière diffuse.

3.3. Température et état hygrométrique

Le local doit être constamment maintenu dans des conditions thermiques et hygrométriques agréables. Sauf circonstances spéciales, il est recommandé d'y maintenir une température de 20 à 22 °C et un état hygrométrique de 60 à 70 % d'humidité relative.

4. DESCRIPTION DES CABINES**4.1. Caractéristiques générales**

Les cabines pour l'analyse sensorielle doivent être montées l'une à côté de l'autre dans la pièce.

Elles doivent être identiques et séparées entre elles par des cloisons suffisamment hautes et larges pour isoler les dégustateurs une fois assis.

Les cabines peuvent être fabriquées avec tout matériau approprié et d'entretien facile (par exemple, bois, contre-plaqué vitrifié, panneaux laminés, etc.). En cas d'utilisation de peintures, celles-ci doivent être tout à fait inodores après séchage.

Les sièges prévus dans chaque cabine doivent être confortables et à hauteur réglable.

Chaque cabine doit être pourvue également d'éclairage individuel réglable tant en ce qui concerne la direction que l'intensité.

Il serait très souhaitable de munir les cabines d'un poussoir faisant fonctionner un avertisseur lumineux, devant permettre au dégustateur de communiquer à la personne qui s'occupe de lui de l'extérieur, sans pour autant distraire les autres, qu'il a achevé l'essai, qu'il désire qu'on lui remette de nouveaux échantillons, qu'il lui manque un ustensile quelconque, qu'il a observé quelque irrégularité ou encore qu'il souhaite des renseignements, etc.

4.2. Dimensions

Les cabines doivent être suffisamment amples et confortables.

En général, il faut s'en tenir aux dimensions ci-après:

— largeur:

0,75 mètre (sans évier),

⁽¹⁾ La couleur de la pièce et son éclairage peuvent avoir une incidence sur les résultats de l'analyse sensorielle.

▼B

- 0,85 mètre (avec évier),
- longueur:
 - 0,50 mètre (table),
 - 0,20 mètre (excès de la cloison),
- hauteur des cloisons:
 - 0,60 mètre au minimum mesuré à partir de la table,
- hauteur de la table:
 - 0,75 mètre.

4.3. Disposition

La surface de la table doit pouvoir être nettoyée aisément.

Une partie de cette surface doit être réservée au montage d'un évier doté d'eau courante potable. Au cas où cela ne serait pas faisable, cet espace doit être réservé pour y poser une cuvette, un crachoir ou similaire.

Lorsque, pendant la réalisation de l'essai, les échantillons doivent être maintenus à une température constante supérieure ou inférieure à la température ambiante, il convient de disposer d'un équipement approprié à cette fin (bain-marie, plaque de chauffage, etc.).

On peut également installer une étagère, à 1,10 mètre environ du sol, pour y ranger différents accessoires (verres, petit matériel, etc.).

Au cas où la disposition des cabines dans la salle de dégustation le permet, il conviendrait d'installer un dispositif pour faciliter la présentation des échantillons. Ce dispositif peut être en forme de glissière (figure 1), de girelle tournant verticalement (figure 2), ce qui est particulièrement indiqué pour les verres ou coupes de forme haute, ou en passe-plat horizontal si les récipients dans lesquels on sert les échantillons ne sont pas très hauts (figure 3). Tout simplement, la cabine doit comporter une ouverture suffisante pour permettre le passage des plateaux de service et des verres contenant les échantillons à examiner.

5. PIÈCES COMPLÉMENTAIRES

Si l'espace disponible le permet, il conviendrait de prévoir des pièces séparées pour préparer les échantillons (à des fins culinaires ou autres), ranger les verres ou ustensiles, ainsi que pour les discussions préalables ou postérieures aux essais. S'il en était ainsi, il faut assurer que ces pièces soient toujours propres et qu'elles ne gênent pas, de par leurs odeurs, bruits ou causeries des personnes y réunies, le travail du jury dans la salle de dégustation.

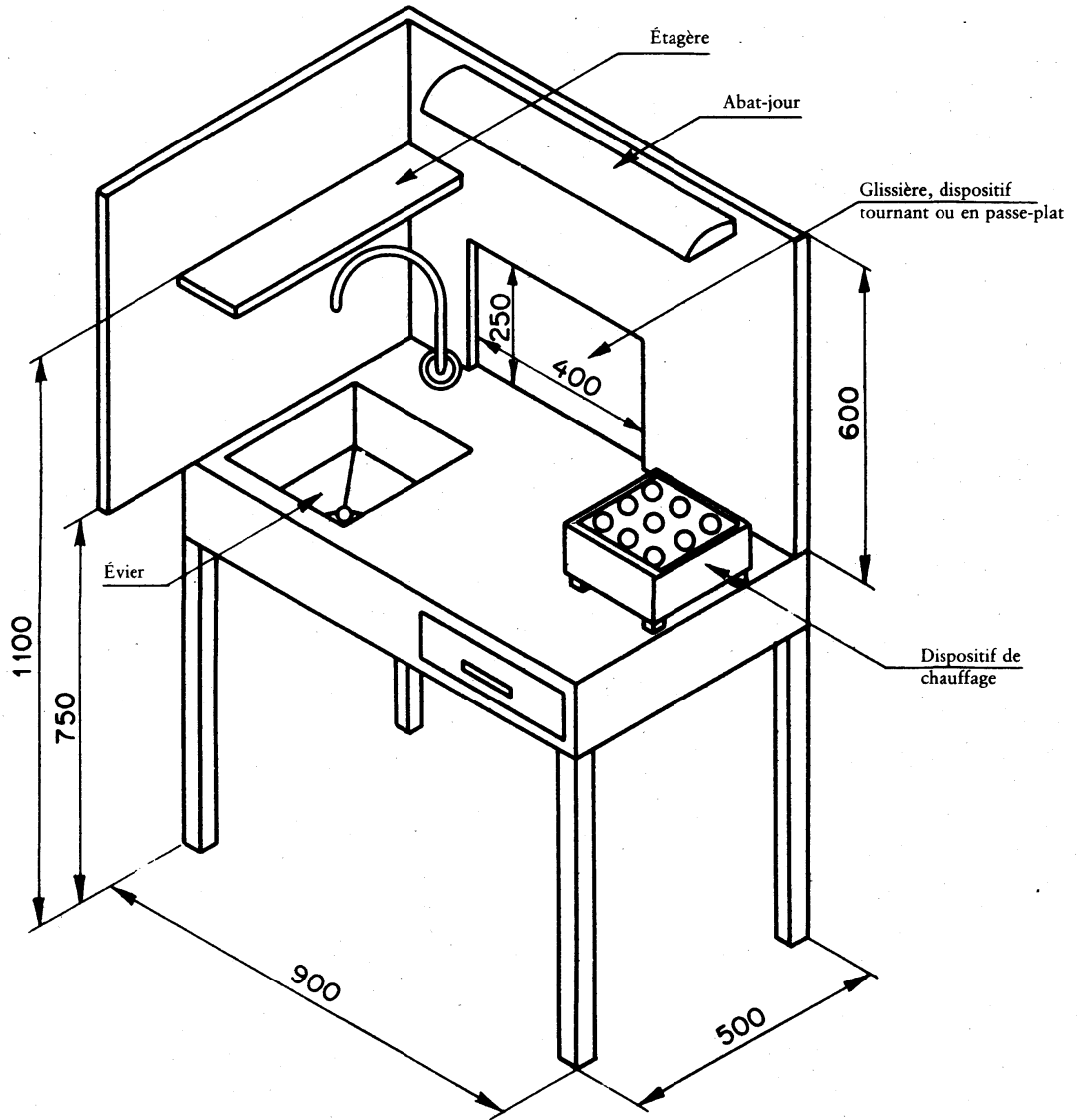
La figure 4 donne un exemple schématisé d'une salle de dégustation et des installations complémentaires.

Note: Les conditions décrites ci-avant sont des conditions idéales. Néanmoins, au cas où il ne serait pas possible de disposer d'une salle réservée uniquement aux analyses sensorielles, les essais pourraient être réalisés dans une pièce réunissant les conditions minimales décrites (lumière, température, bruits, odeurs), en y installant des cabines mobiles à partir d'éléments démontables et pliables, de manière à assurer, tout au moins, la séparation voulue entre chaque dégustateur.

▼B

DISPOSITION DE LA CABINE

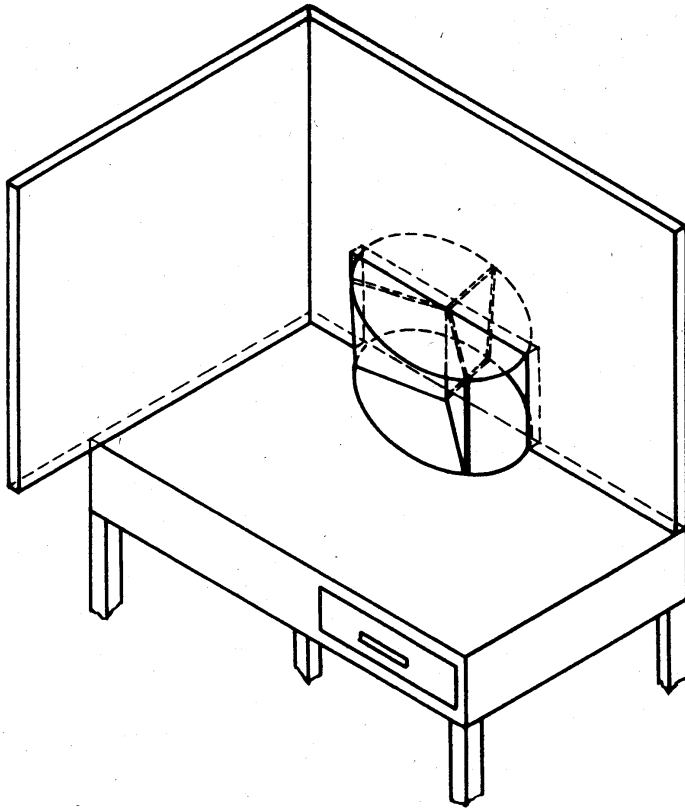
Figure 1



▼B

DISPOSITIF EN GIRELLE POUR LA PRÉSENTATION DES ÉCHANTIL-
LONS

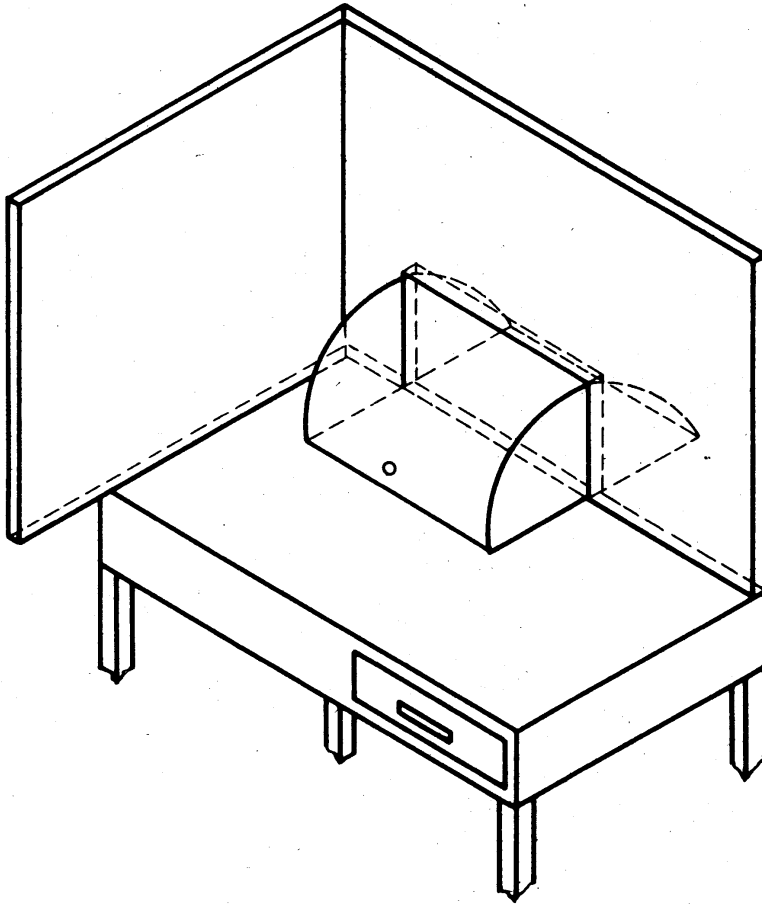
Figure 2



▼B

DISPOSITIF EN PASSE-PLAT POUR LA PRÉSENTATION DES ÉCHAN-
TILLONS

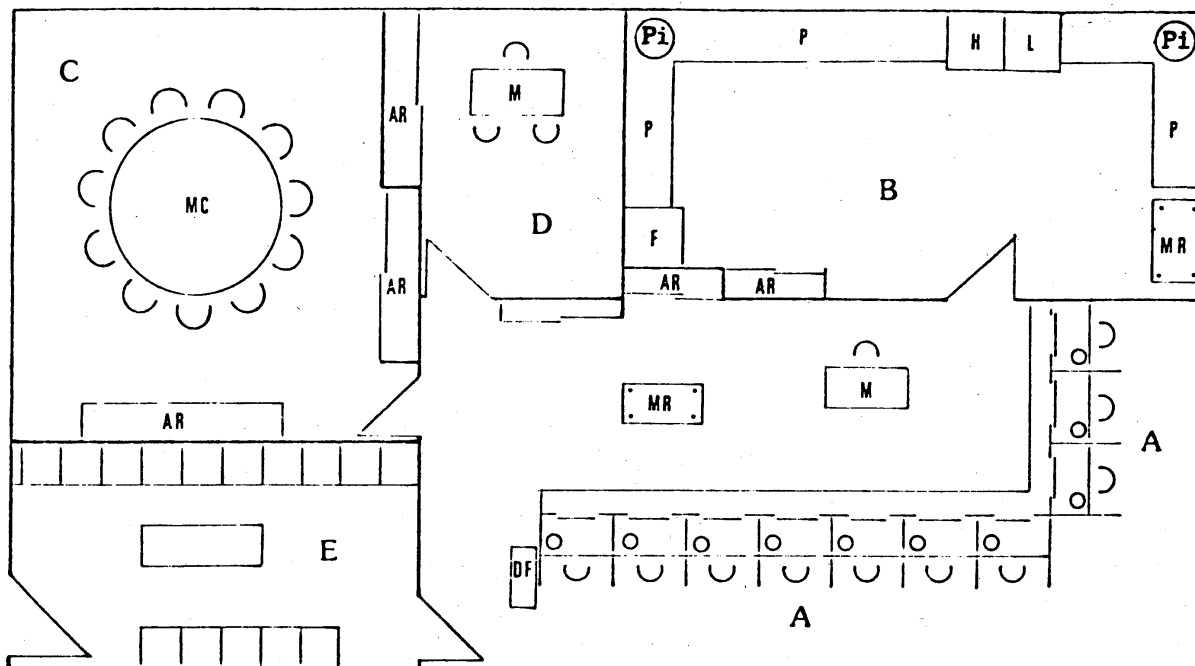
Figure 3



▼B

LABORATOIRE D'ANALYSE SENSORIELLE

Figure 4 — Exemple de salle de dégustation



- A — Cabine
- B — Salle de nettoyage du matériel et de préparation des échantillons
- C — Salle pour un essai en jury ouvert
- D — Bureau
- E — Salle d'attente
- F — Réfrigérateur
- H — Étuve-four
- L — Lave-vaisselle
- Pi — Évier
- AR — Armoire ou placard
- MR — Table roulante auxiliaire
- Df — Distribution d'imprimés
- MC — Table ronde
- M — Table
- P — Paillasse

▼B

ANNEXE XIII

▼M6**NEUTRALISATION ET DÉCOLORATION DE L'HUILE D'OLIVE EN LABORATOIRE****▼B****1. NEUTRALISATION ET DÉCOLORATION DE L'HUILE D'OLIVE EN LABORATOIRE****1.1. Neutralisation de l'huile****1.1.1. Appareillage**

- becher de 300 millilitres de forme haute,
- centrifugeuse de laboratoire avec tubes de 100 millilitres,
- becher de 250 millilitres,
- ballons de 100 millilitres,
- ampoule à décanter d'un litre.

1.1.2. Réactifs

- solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 12 %,
- solution éthanolique à 1 % de phénolphtaléine,
- hexane pur pour analyse,
- alcool isopropylique pur pour analyse.

1.1.3. Mode opératoire**a) Huiles d'acidité exprimée en acide oléique inférieure à 30 %**

Introduire, dans un becher de 300 millilitres de forme haute, 50 grammes d'huile brute et chauffer à 65 °C au bain-marie. En agitant lentement, ajouter une quantité de solution d'hydroxyde de sodium à 12 % correspondant à l'acidité libre de l'huile, avec un excès de 5 %. Continuer à agiter pendant cinq minutes, en maintenant la température à 65 °C.

Transférer le tout dans des tubes à centrifuger de 100 millilitres, séparer la pâte savonneuse par centrifugation. Verser l'huile décanter dans un becher de 250 millilitres et laver avec 50 à 60 millilitres d'eau distillée bouillante tout en éliminant la couche aqueuse à l'aide d'un siphon. Répéter les lavages jusqu'à élimination complète des traces de savon résiduel (disparition de la coloration rose à la phénolphtaléine).

Centrifuger l'huile pour éliminer les petites quantités d'eau résiduelle.

b) Huiles d'acidité exprimée en acide oléique supérieure à 30 %

Dans une ampoule à décanter d'un litre, introduire 50 grammes d'huile brute. 200 millilitres d'hexane, 100 millilitres d'alcool isopropylique et une quantité de solution d'hydroxyde de sodium à 12 % correspondant à l'acidité libre de l'huile, avec un excès de 0,3 %. Agiter énergiquement pendant une minute. Ajouter 100 millilitres d'eau distillée, agiter de nouveau et laisser reposer.

Après séparation des couches, laisser s'écouler la couche inférieure contenant les savons. Entre les deux couches (huileuse au-dessus et aqueuse au-dessous) se forme souvent une couche intermédiaire constituée de mucilages et de substances insolubles qui doit également être éliminée.

Procéder ensuite au lavage de la solution hexanique d'huile neutre avec des portions de 50 à 60 millilitres d'une solution d'alcool isopropylique/eau distillée 1/1 (v/v) jusqu'à disparition de la coloration rose à la phénolphtaléine. Procéder ensuite à l'élimination complète de l'hexane par distillation sous vide (par exemple, à l'évaporateur rotatif).

1.2. Décoloration de l'huile neutralisée**1.2.1. Appareillage**

- ballon de 250 millilitres à 3 cols rodés permettant d'insérer:
 - a) un thermomètre gradué en degrés et permettant de faire des lectures jusqu'à 90 °C;

▼B

- b) un agitateur mécanique tournant à 250-300 tours par minute équipé pour le fonctionnement sous vide;
 - c) un raccord vers la pompe à vide,
- pompe à vide, munie d'un manomètre, capable de donner des pressions résiduelles de 15-30 millibars.

1.2.2 Mode opératoire

Peser dans le ballon à 3 cols 100 grammes environ de l'huile neutralisée. Insérer le thermomètre et l'agitateur, relier à la pompe à vide et chauffer jusqu'à 90 °C en agitant.

Maintenir cette température, toujours sous agitation, jusqu'à ce que l'huile à analyser soit totalement débarrassée de son humidité (trente minutes environ).

Interrompre alors le vide et ajouter 2 à 3 grammes de terre activée. Rétablir le vide jusqu'à obtention d'une pression résiduelle de 15-30 millibars et, toujours à la température de 90 °C, agiter pendant trente minutes à 250 tours par minute environ.

Filtrer ensuite à chaud dans une étuve thermostatique (50-60 °C).

▼M6

ANNEXE XIV

NOTES COMPLÉMENTAIRES 2, 3 ET 4 DU CHAPITRE 15 DE LA NOMENCLATURE COMBINÉE

2. A. Ne relèvent des n^{os} 1509 et 1510 que les huiles provenant exclusivement du traitement des olives et dont les caractéristiques analytiques relatives aux teneurs en acides gras et en stérols sont les suivantes:

Tableau I — Teneur en acides gras en pourcentage des acides gras totaux		Tableau II — Teneur en stérols en pourcentage des stérols totaux	
Acide myristique	M 0,1	Cholestérol	M 0,5
Acide linoléique	M 0,9	Brassicastérol	M 0,2
Acide arachidique	M 0,7	Campestérol	M 4,0
Acide eicosénoïque	M 0,5	Stigmastérol ⁽¹⁾	< Campestérol
Acide béhénique	M 0,3	Béta-Sitostérol ⁽²⁾	m 93,0
Acide lignocérique	M 0,5	Delta-7-Stigmastérol	M 0,5

m = minimum

M = maximum

(1) Condition non valable pour les huiles d'olive vierges lampantes (sous-position 1509 10 10) et pour les huiles de grignons d'olive brutes (sous-position 1510 00 10).

(2) Delta-5, 23-Stigmastadiénoïl + Chlérostérol + Béta-Sitostérol + Sitostanol + Delta-5-Avenastérol + Delta-5, 24-Stigmastadiénoïl

Ne relèvent pas des n^{os} 1509 et 1510 les huiles d'olives modifiées chimiquement (notamment les huiles réestérifiées) et les mélanges d'huile d'olive avec des huiles d'une autre nature. La présence d'huile d'olive réestérifiée ou d'huiles d'une autre nature est établie à l'aide des méthodes indiquées dans les annexes V, VII, X A et X B du règlement (CEE) n^o 2568/91.

- B. Ne relèvent de la sous-position 1509 10 que les huiles d'olive définies aux points I et II ci-après obtenues uniquement par des procédés mécaniques, ou par d'autres procédés physiques, dans des conditions, notamment thermiques, n'altérant pas l'huile, et qui n'ont subi d'autres traitements que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration. Les huiles obtenues à partir de l'olive à l'aide de solvants relèvent de la position 1510.
- I. Est considérée comme «huile d'olive vierge lampante», au sens de la sous-position 1509 10 10, quelle que soit son acidité, l'huile présentant:
- une teneur en alcools aliphatiques non supérieure à 400 mg/kg;
 - une teneur en érythrodiol et uvaol non supérieure à 4,5 %;
 - un contenu en acides gras saturés dans la position 2 des triglycérides non supérieur à 1,3 %;
 - la somme des isomères transoléiques inférieure à 0,10 % et la somme des isomères translinoléiques + translinoléiques inférieure à 0,10 %;
- et
- e) une ou plusieurs des caractéristiques suivantes:
- un nombre de peroxyde supérieur à 20 mEq d'oxygène actif/kg;
 - une teneur en solvants halogénés volatils totaux supérieure à 0,2 mg/kg ou supérieure à 0,1 mg/kg pour au moins l'un d'entre eux;
 - un coefficient d'extinction K_{270} supérieur à 0,25 et, après traitement de l'huile sur alumine activée, non supérieur à 0,11; en effet, certaines huiles ayant une teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique, supérieure à 3,3 g par 100 g peuvent avoir, après passage sur alumine activée, conformément à la méthode indiquée dans l'annexe IX du règlement (CEE) n^o 2568/91, un coefficient d'extinction K_{270} supérieur à 0,10; dans ce cas, après neutralisation et décoloration effectuées en laboratoire, conformément à la méthode reprise à l'annexe XIII du

▼ **M6**

règlement précité, elles doivent avoir les caractéristiques suivantes:

- un coefficient d'extinction K_{270} non supérieur à 1,20,
- une variation (ΔK) du coefficient d'extinction au voisinage de 270 nm supérieure à 0,01 et non supérieure à 0,16, soit:

$$\Delta K = K_m - 0,5 (K_{m-4} + K_{m+4})$$

K_m désigne le coefficient d'extinction à la longueur d'onde du maximum de la courbe d'absorption au voisinage de 270 nm,

K_{m-4} et K_{m+4} désignent les coefficients d'extinction aux longueurs d'onde inférieure et supérieure à 4 nm à celle de K_m ;

- 4) des caractéristiques organoleptiques faisant apparaître des défauts perceptibles avec une intensité supérieure à la limite d'acceptabilité, avec un résultat d'analyse sensorielle inférieur à 3,5 conformément à l'annexe XII du règlement (CEE) n° 2568/91.

II. Est considérée comme «autre huile d'olive vierge», au sens de la sous-position 1509 10 90, l'huile d'olive qui présente les caractéristiques suivantes:

- a) une acidité, exprimée en acide oléique, non supérieure à 3,3 g/100 g;
- b) un nombre de peroxyde non supérieur à 20 mEq d'oxygène actif/kg;
- c) une teneur en alcools aliphatiques non supérieure à 300 mg/kg;
- d) une teneur en solvants halogénés volatils totaux non supérieure à 0,2 mg/kg et pour chacun d'eux une teneur non supérieure à 0,1 mg/kg;
- e) un coefficient d'extinction K_{270} non supérieur à 0,25 et, après passage de l'huile sur alumine activée, non supérieur à 0,10;
- f) une variation du coefficient d'extinction ($-K$) au voisinage de 270 nm non supérieure à 0,01;
- g) des caractéristiques organoleptiques faisant même apparaître des défauts perceptibles avec une intensité inférieure à la limite d'acceptabilité, avec un résultat d'analyse sensorielle égal ou supérieur à 3,5, conformément à l'annexe XII du règlement (CEE) n° 2568/91;
- h) une teneur en érythrodiol + uvaol non supérieure à 4,5 %;
- i) un contenu d'acides gras saturés dans la position 2 des triglycérides non supérieur à 1,3 %;
- j) la somme des isomères transoléiques inférieure à 0,03 % et la somme des isomères translinoléiques + translinoléiques inférieure à 0,03 %.

C. Relève de la sous-position 1509 90 00 l'huile d'olive obtenue par traitement des huiles relevant des sous-positions 1509 10 10 et/ou 1509 10 90, même coupée d'huile d'olive vierge, et qui présente les caractéristiques suivantes:

- a) une acidité, exprimée en acide oléique, non supérieure à 3,3 g/100 g;
- b) une teneur en alcools aliphatiques non supérieure à 350 mg/kg;
- c) un coefficient d'extinction K_{270} supérieur à 0,25 et non supérieur à 1,20 et, après passage de l'huile sur alumine activée, supérieur à 0,10;
- d) une variation du coefficient d'extinction ($-K$) au voisinage de 270 nm supérieure à 0,01 et non supérieure à 0,16;
- e) une teneur en érythrodiol et uvaol non supérieure à 4,5 %;
- f) un contenu en acides gras saturés dans la position 2 des triglycérides non supérieur à 1,5 %;
- g) la somme des isomères transoléiques inférieure à 0,20 % et la somme des isomères translinoléiques + translinoléiques inférieure à 0,30 %.

▼M6

- D. Sont considérées comme «huiles brutes» au sens de la sous-position 1510 00 10 les huiles, notamment les huiles de grignons d'olive, qui présentent les caractéristiques suivantes:
- a) une acidité, exprimée en acide oléique, égale ou supérieure à 2 g/100 g;
 - b) une teneur en érythrodiol et uvaol égale ou supérieure à 12 %;
 - c) un contenu d'acides gras saturés dans la position 2 des triglycérides non supérieur à 1,8 %;
 - d) la somme des isomères transoléiques inférieure à 0,20 % et la somme des isomères translinoléiques + translinoléiques inférieure à 0,10 %.
- E. Relèvent de la sous-position 1510 00 90 les huiles obtenues par traitement des huiles relevant de la sous-position 1510 00 10, même coupées d'huile d'olive vierge, ainsi que celles ne présentant pas les caractéristiques des huiles visées aux notes complémentaires 2 B, 2 C et 2 D. Les huiles de la présente sous-position doivent avoir un contenu d'acides gras saturés dans la position 2 des triglycérides non supérieur à 2 %, la somme des isomères transoléiques inférieure à 0,40 % et la somme des isomères translinoléiques + translinoléiques inférieure à 0,35 %.
3. Ne relèvent pas des sous-positions 1522 00 31 et 1522 00 39:
- a) les résidus provenant du traitement des corps gras contenant de l'huile dont l'indice d'iode, déterminé selon la méthode indiquée à l'annexe XVI du règlement (CEE) n° 2568/91 est inférieur à 70 ou supérieur à 100;
 - b) les résidus provenant du traitement des corps gras contenant de l'huile dont l'indice d'iode est compris entre 70 et 100, mais dont la surface du pic ayant le temps de rétention du Béta-Sitostérol⁽¹⁾, déterminée conformément à l'annexe V du règlement (CEE) n° 2568/91, représente moins de 93 % de la superficie totale des pics des stérols.
4. Les méthodes d'analyse à suivre pour la détermination des caractéristiques des produits en question ci-dessus sont celles prévues aux annexes du règlement (CEE) n° 2568/91.

⁽¹⁾ Delta-5, 23-Stigmastadiénol + Chlérosterol + Béta-Sitostérol + Sitostanol + Delta-5-Avenastérol + Delta-5, 24-Stigmastadiénol



ANNEXE XV

1. TENEUR EN HUILE DES GRIGNONS D'OLIVE

1.1. Matériel

- appareil d'extraction approprié muni d'un ballon de 200 à 250 millilitres,
- bain à chauffage électrique (bain de sable, bain d'eau, etc.) ou plaque chauffante,
- balance analytique,
- étuve réglée à 80 °C au maximum,
- étuve à chauffage électrique muni d'un dispositif de thermostatisation réglé à 103 °C ± 2 °C et permettant de réaliser une insufflation d'air ou une pression réduite,
- broyeur mécanique facile à nettoyer et permettant le broyage sans échauffement et sans diminution sensible de leur teneur en eau et en huile,
- cartouche d'extraction et coton hydrophile ou papier filtre, exempts de produits extractibles à l'hexane,
- dessiccateur,
- tamis à trous de 1 millimètre de diamètre,
- pierre ponce en petits grains, préalablement séchée.

1.2. Réactif

n-hexane technique dont le résidu à l'évaporation complète doit être inférieur à 0,002 gramme pour 100 millilitres.

2. MODE OPÉRATOIRE

2.1. Préparation de l'échantillon pour essai

Broyer l'échantillon pour laboratoire, si nécessaire, dans le broyeur mécanique préalablement bien nettoyé afin de le réduire en particules pouvant traverser complètement le tamis.

Utiliser un vingtième environ de l'échantillon pour parfaire le nettoyage du broyeur, rejeter cette mouture, broyer le reste, le recueillir, le mélanger avec soin et l'analyser sans délai.

2.2. Prise d'essai

Peser, à 0,01 gramme près, dès la fin du broyage, environ 10 grammes de l'échantillon pour essai.

2.3. Préparation de la cartouche d'extraction

Placer la prise d'essai dans la cartouche et boucher celle-ci avec le tampon de coton hydrophile. Dans le cas où on a utilisé un papier filtre, emballer la mouture dans ce papier.

2.4. Préséchage

Si le grignon est très humide (teneur en eau et en matières volatiles supérieure à 10 %), effectuer un préséchage en plaçant pendant un temps convenable la cartouche remplie (ou le papier filtre) dans l'étuve chauffée à 80 °C au maximum, pour ramener la teneur en eau et en matières volatiles au-dessous de 10 %.

2.5. Préparation du ballon

Peser, à 1 milligramme près, le ballon contenant 1 à 2 grains de pierre ponce, préalablement séché à l'étuve à 103 °C ± 2 °C puis refroidi pendant au moins une heure dans un dessiccateur.

2.6. Première extraction

Placer dans l'appareil d'extraction la cartouche (ou le papier filtre) contenant la prise d'essai. Verser dans le ballon la quantité nécessaire d'hexane. Adapter le ballon à l'appareil d'extraction et placer le tout sur le bain à chauffage électrique. Conduire le chauffage dans des conditions telles que le débit du reflux soit au moins de trois gouttes à la seconde (ébullition modérée, non tumultueuse).

▼B

Après quatre heures d'extraction, laisser refroidir. Enlever la cartouche de l'appareil d'extraction et la placer dans un courant d'air afin d'éliminer la majeure partie du solvant qui l'imprègne.

2.7. Deuxième extraction

Vider la cartouche dans le microbroyeur et broyer aussi finement que possible. Replacer quantitativement le mélange dans la cartouche et celle-ci dans l'appareil d'extraction.

Recommencer l'extraction pendant encore deux heures en utilisant le même ballon contenant la première extraction.

La solution obtenue dans le ballon d'extraction doit être limpide. À défaut, la filtrer sur un papier filtre en lavant plusieurs fois le premier ballon et le papier filtre avec de l'hexane. Recueillir le filtrat et le solvant de lavage dans un deuxième ballon préalablement séché et taré à 1 milligramme près.

2.8. Élimination du solvant et pesée de l'extrait

Chasser par distillation sur bain à chauffage électrique la majeure partie du solvant. Éliminer les dernières traces de solvant en chauffant le ballon à l'étuve à $103 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 20 minutes. Faciliter cette élimination, soit en insufflant de l'air de temps à autre ou de préférence un gaz inerte, soit en opérant sous pression réduite.

Laisser refroidir le ballon dans un dessiccateur pendant au moins une heure, et le peser à 1 milligramme près.

Chauffer à nouveau 10 minutes dans les mêmes conditions, refroidir au dessiccateur et peser.

La différence entre les résultats de ces deux pesées doit être inférieure ou égale à 10 milligrammes. Sinon, chauffer à nouveau pendant des périodes de dix minutes suivies du refroidissement et de la pesée, jusqu'à ce que la différence de masse soit au plus égale à 10 milligrammes. Retenir la dernière pesée du ballon.

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour essai.

3. EXPRESSION DES RÉSULTATS**3.1. Mode de calcul et formule**

a) L'extrait exprimé en pourcentage en masse du produit tel quel, est égal à:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

où: S est le pourcentage en masse d'extrait du produit tel quel,

m_0 est la masse, en grammes, de la prise d'essai,

m_1 est la masse, en grammes, de l'extrait après séchage.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations, si les conditions de répétabilité sont remplies.

Exprimer le résultat avec une seule décimale.

b) L'extrait est rapporté à la matière sèche en utilisant la formule suivante:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{extrait en \% gras/sec}$$

où: S est le pourcentage en masse d'extrait du produit tel quel [voir sous a)],

U est sa teneur en eau et en matières volatiles.

3.2. Répétabilité

La différence entre les résultats des deux déterminations, effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas être supérieure à 0,2 gramme d'extrait à l'hexane pour 100 grammes d'échantillon.

▼B

Dans le cas contraire, répéter l'analyse sur deux autres prises d'essai. Si cette fois encore la différence dépasse 0,2 gramme, prendre comme résultat la moyenne arithmétique des quatre déterminations effectuées.



ANNEXE XVI

DÉTERMINATION DE L'INDICE D'IODE

1. OBJET

La présente norme internationale décrit une méthode destinée à la détermination de l'indice d'iode dans les corps gras d'origine animale et végétale.

2. DÉFINITION

Aux fins de la présente norme internationale, les définitions suivantes sont applicables.

2.1. Indice d'iode: la masse d'iode absorbée par l'échantillon dans les conditions opératoires spécifiées par la présente norme internationale.

L'indice d'iode est exprimé en nombre de grammes d'iode par 100 grammes d'échantillon.

3. PRINCIPE

Mise en solution d'une prise d'essai dans un solvant et addition du réactif de Wijs. Au terme d'un laps de temps déterminé, addition d'une solution d'iodure de potassium et d'eau; titrage de l'iode libéré par une solution de thiosulfate de sodium.

4. RÉACTIFS

Tous les réactifs sont de qualité analytique reconnue.

4.1. Iodure de potassium, solution à 100 grammes par litre, exempte d'iode ou d'iodate.

4.2. Solution d'amidon.

Mélanger 5 grammes d'amidon soluble dans 30 millilitres d'eau, ajouter ce mélange à 1 000 millilitres d'eau bouillante, bouillir 3 minutes et laisser refroidir.

4.3. Solution volumétrique standard de thiosulfate de sodium.

$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1$ mole par litre, normalisé pas plus de sept jours avant l'usage.

4.4. Solvant préparé en mélangeant des volumes égaux de cyclohexane et d'acide acétique.

4.5. Réactif de Wijs contenant du monochlorure d'iode dans de l'acide acétique. Utiliser le réactif de Wijs se trouvant dans le commerce.

Note: Le réactif contient 9 grammes de ICl_3 + 9 grammes de I dans l'acide acétique.

5. APPAREILLAGE

Le matériel courant de laboratoire et notamment:

5.1. Nacelles de pesée en verre, appropriées à la prise d'essai et pouvant être introduites dans les fioles (5.2).

5.2. Fioles coniques, d'une capacité de 500 millilitres, pourvues de bouchons en verre et complètement sèches.

6. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON À ANALYSER. L'ÉCHANTILLON HOMOGÉNÉISÉ EST SÉCHÉ SUR SULFATE DE SODIUM ET FILTRÉ.

7. MODE OPÉRATOIRE

7.1. Prise d'essai

La masse de la prise d'essai varie selon l'indice d'iode présumé, comme l'indique le tableau 1.

▼B

Tableau 1

Indice d'iode présumé	Masse de la prise d'essai (en g)
moins que 5	3,00
5 à 20	1,00
21 à 50	0,40
51 à 100	0,20
101 à 150	0,13
151 à 200	0,10

Peser la prise d'essai à 0,1 milligramme près dans une nacelle de pesée en verre (5.1).

7.2. Détermination

Introduire la prise d'essai dans une fiole de 500 millilitres (5.2). Ajouter 20 millilitres de solvant (4.4) pour dissoudre les corps gras. Ajouter exactement 25 millilitres du réactif de Wijs (4.5), boucher, agiter le contenu et placer la fiole dans un endroit sombre. Ne pas utiliser de pipette pour le réactif de Wijs.

Préparer un essai à blanc avec le solvant et le réactif mais sans la prise d'essai.

Pour les échantillons ayant un indice d'iode inférieur à 150, laisser les fioles dans un endroit sombre pendant 1 heure; pour ceux ayant un indice d'iode supérieur à 150 et pour les produits polymérisés ou des produits oxydés dans une mesure considérable, les laisser pendant 2 heures.

Une fois ce laps de temps écoulé, ajouter 20 millilitres de la solution d'iodure de potassium (4.1) et 150 millilitres d'eau dans chaque fiole.

Titre avec la solution de thiosulfate de sodium volumétrique standard (4.3) jusqu'à ce que la couleur jaune due à l'iode ait pratiquement disparu. Ajouter quelques gouttes de la solution d'amidon (4.2) et poursuivre la titration jusqu'au moment où la couleur bleue disparaît après avoir agité vigoureusement le contenu.

Note: La détermination potentiométrique du point final est tolérée.

7.3. Nombre de déterminations

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon.

8. EXPRESSION DES RÉSULTATS

L'indice d'iode est égal à:

$$\frac{12,69 c (V_1 - V_2)}{m}$$

où:

c: valeur numérique de la concentration exacte, en moles par litre, de la solution de thiosulfate de sodium volumétrique standard (4.3) utilisée;

V₁: valeur numérique du volume, en millilitres, de la solution de thiosulfate de sodium volumétrique standard (4.3) utilisée pour l'essai à blanc;

V₂: valeur numérique du volume, en millilitres, de la solution de thiosulfate de sodium volumétrique standard (4.3) utilisée pour la détermination;

m: valeur numérique de la masse, en grammes, de la prise d'essai (7.1).

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations, à condition que le critère de répétabilité soit rempli.