

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
► M1	Règlement (CEE) n° 3682/91 de la Commission du 17 décembre 1991	L 349	36	18.12.1991
► M2	Règlement (CEE) n° 1429/92 de la Commission du 26 mai 1992	L 150	17	2.6.1992
► M3	Règlement (CEE) n° 1683/92 de la Commission du 29 juin 1992	L 176	27	30.6.1992
► M4	Règlement (CEE) n° 1996/92 de la Commission du 15 juillet 1992	L 199	18	18.7.1992
► M5	Règlement (CEE) n° 3288/92 de la Commission du 12 novembre 1992	L 327	28	13.11.1992
► M6	Règlement (CEE) n° 183/93 de la Commission du 29 janvier 1993	L 22	58	30.1.1993
► M7	modifié par le règlement (CEE) n° 826/93 de la Commission du 6 avril 1993	L 87	6	7.4.1993
► M8	Règlement (CEE) n° 620/93 de la Commission du 17 mars 1993	L 66	29	18.3.1993
► M9	Règlement (CE) n° 177/94 de la Commission du 28 janvier 1994	L 24	33	29.1.1994
► M10	Règlement (CE) n° 2632/94 de la Commission du 28 octobre 1994	L 280	43	29.10.1994
► M11	Règlement (CE) n° 656/95 de la Commission du 28 mars 1995	L 69	1	29.3.1995
► M12	Règlement (CE) n° 2527/95 de la Commission du 27 octobre 1995	L 258	49	28.10.1995
► M13	Règlement (CE) n° 2472/97 de la Commission du 11 décembre 1997	L 341	25	12.12.1997
► M14	Règlement (CE) n° 282/98 de la Commission du 3 février 1998	L 28	5	4.2.1998
► M15	Règlement (CE) n° 2248/98 de la Commission du 19 octobre 1998	L 282	55	20.10.1998
► M16	Règlement (CE) n° 379/1999 de la Commission du 19 février 1999	L 46	15	20.2.1999
► M17	Règlement (CE) n° 455/2001 de la Commission du 6 mars 2001	L 65	9	7.3.2001
► M18	Règlement (CE) n° 2042/2001 de la Commission du 18 octobre 2001	L 276	8	19.10.2001
► M19	Règlement (CE) n° 796/2002 de la Commission du 6 mai 2002	L 128	8	15.5.2002
► M20	Règlement (CE) n° 1989/2003 de la Commission du 6 novembre 2003	L 295	57	13.11.2003
► M21	Règlement (CE) n° 702/2007 de la Commission du 21 juin 2007	L 161	11	22.6.2007
► M22	Règlement (CE) n° 640/2008 de la Commission du 4 juillet 2008	L 178	11	5.7.2008
► M23	Règlement (UE) n° 61/2011 de la Commission du 24 janvier 2011	L 23	1	27.1.2011
► M24	Règlement d'exécution (UE) n° 661/2012 de la Commission du 19 juillet 2012	L 192	3	20.7.2012

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 (2568/91)
- **C3** Rectificatif, JO L 111 du 30.4.2011, p. 48 (61/2011)

▼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;

⁽¹⁾ JO n° 172 du 30.9.1966, p. 3025/66.⁽²⁾ JO n° L 353 du 17.12.1990, p. 23.

▼B

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 ⁽¹⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 1858/88 ⁽²⁾;

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

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

▼M20*Article premier*

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

⁽¹⁾ JO n° L 128 du 24.5.1977, p. 6.

⁽²⁾ JO n° L 166 du 1.7.1988, p. 10.

▼ B*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,

▼ M19

- pour la détermination de la teneur en cires, la méthode reprise à l'annexe IV,

▼ B

- 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,

▼ M21

- pour la détermination du pourcentage du 2-glycéril monopalmitate, la méthode reprise à l'annexe VII,

▼ M20

▼ B

- 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,

▼ M20

▼ M11

- pour la détermination des stigmastadiènes, la méthode reprise à l'annexe XVII,

▼ M13

- pour la détermination de la composition des triglycérides à ECN42, la méthode reprise à l'annexe XVIII,

▼ M19

- pour la détermination du contenu en alcools aliphatiques, la méthode reprise à l'annexe XIX,

▼ M23

- pour la détermination de la teneur en cires et en esters méthyliques et éthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, la méthode reprise à l'annexe XX.

▼ M19

2. La vérification par les autorités nationales ou leurs représentants des caractéristiques organoleptiques des huiles d'olive vierges est réalisée par des jurys de dégustateurs agréés par les États membres.

Les caractéristiques organoleptiques d'une huile d'olive visée au premier alinéa sont considérées comme conformes à la catégorie d'huile d'olive déclarée, si un jury agréé par l'État membre concerné confirme le classement à cet égard.

Dans le cas où le jury agréé ne confirme pas la déclaration en ce qui concerne les caractéristiques organoleptiques de la catégorie d'huile d'olive déclarée, les autorités nationales ou leurs représentants font procéder à la demande de l'intéressé à deux contre analyses, par d'autres jurys agréés, dont au moins une est effectuée par un jury agréé par l'État membre producteur concerné. Les caractéristiques en question sont considérées comme conformes à celles qui sont déclarées si les deux contre analyses confirment le classement déclaré. Dans le cas contraire les frais des contre analyses, sans préjudice des sanctions encourues, sont imputées à l'intéressé.

▼ M17

3. En ce qui concerne la vérification par les autorités nationales ou leurs représentants des caractéristiques des huiles, prévues au paragraphe 1, le prélèvement des échantillons est effectué selon les normes internationales EN ISO 661 et EN ISO 5555 relatives à la préparation des échantillons pour essai et à l'échantillonnage. Toutefois, par dérogation au point 6.8 de la norme EN ISO 5555, pour les lots constitués par lesdites huiles, en emballages immédiats inférieurs ou égaux à 100 litres, le prélèvement de l'échantillon s'effectue conformément à l'annexe I *bis* du présent règlement.

▼ M19

Sans préjudice des dispositions de la norme EN ISO 5555 et du chapitre 6 de la norme EN ISO 661, les échantillons sont mis à l'abri de la lumière et des fortes chaleurs dans le plus bref délai et sont envoyés au laboratoire pour les analyses au plus tard:

— le dixième jour ouvrable suivant celui du prélèvement, pendant les mois d'octobre à mai et

— le cinquième jour ouvrable suivant celui du prélèvement, pendant les mois de juin à septembre.

▼ M17

4. ► **M20** Pour la vérification prévue au paragraphe 3, les analyses visées aux annexes II, III, IX, X et XII, ainsi que, le cas échéant, les contre-analyses prévues par les législations nationales, sont effectuées avant la date de durabilité minimale. Dans le cas où la prise de l'échantillon s'effectue plus de quatre mois avant la date de durabilité minimale, lesdites analyses sont effectuées au plus tard le quatrième mois suivant celui de la prise de l'échantillon. Aucun délai ne s'applique pour les autres analyses prévues par ledit règlement. ◀

▼ M17

Sauf si la prise d'échantillon a eu lieu moins d'un mois avant la date de durabilité minimale, dans le cas où les résultats des analyses ne correspondent pas aux caractéristiques de la catégorie d'huile d'olive ou de grignons d'olive déclarée, l'intéressé en reçoit notification au plus tard un mois avant la fin du délai visé au premier alinéa.

▼ M19

5. Pour la détermination des caractéristiques des huiles d'olive effectuée selon les méthodes prévues au paragraphe 1, les résultats des analyses sont directement comparés avec les limites prévues par le présent règlement.

▼ M20*Article 2 bis*

La vérification par les autorités nationales ou leurs représentants de la conformité d'un échantillon des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive avec la catégorie déclarée peut s'effectuer:

- a) soit en réalisant, dans n'importe quel ordre, les analyses prévues à l'annexe I;
- b) soit suivant l'ordre prévu à l'annexe I *ter* relatif au schéma décisionnel, jusqu'à aboutir à une des décisions mentionnées par ledit schéma.

▼ M19**▼ M5***Article ► M19 3 ◀*

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***▼ M19**

1. Aux fins de l'appréciation et du contrôle par les autorités nationales ou leur représentant des caractéristiques organoleptiques, les États membres peuvent agréer des jurys de dégustateurs.

Les conditions d'agrément sont établies par les États membres, notamment de façon à:

- répondre aux conditions de l'annexe XII, point 4.
- assurer que la formation du chef du jury soit effectuée par un établissement et dans des conditions, reconnus à cet effet par l'État membre.

▼ M19

- soumettre la validité de l'agrément aux résultats des performances obtenues dans le cadre d'un système de contrôle annuel institué par l'État membre.

Chaque État membre communique à la Commission la liste des jurys agréés ainsi que les mesures prises en conformité avec le présent paragraphe.

▼ M5

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.

▼ M19**▼ 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.

▼ M20*Article 7*

Les dispositions communautaires concernant la présence de contaminants sont applicables.

En ce qui concerne la teneur en solvants halogénés les limites pour toutes les catégories d'huiles d'olive sont les suivantes:

- teneur maximale de chaque solvant halogéné détecté: 0,1 mg/kg,
- teneur maximale de la somme des solvants halogénés détectés: 0,2 mg/kg

▼ B*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.

▼ B

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.

▼ 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 I bis:	Échantillonnage des lots d'huile d'olive ou d'huile de grignons d'olive en emballages immédiats de 100 litres au maximum
Annexe I ter:	Schéma décisionnel
Annexe II:	► M21 Détermination des acides gras libres, méthode à froid ◀
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:	► M21 Détermination du pourcentage du 2-glycéryl monopalmitate ◀

▼ M20**▼ B**

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

▼ M20**▼ M19****▼ B**

Annexe XV:	Teneur en huile des grignons d'olive
Annexe XVI:	Détermination de l'indice d'iode
Annexe XVII:	Méthode de détermination des stigmastadiènes dans les huiles végétales
Annexe XVIII:	Méthode de détermination de la composition des triglycérides à ECN42
Annexe XIX:	Méthode de détermination du contenu en alcools aliphatiques

▼ M23

Annexe XX:	méthode de détermination de la teneur en cires et en esters méthyliques et éthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire
------------	---

ANNEXE I

CARACTERISTIQUES DES HUILES D'OLIVE

Catégorie	Esters méthyliques d'acides gras (EMAG) et esters éthyliques d'acides gras (EEAG)	Acidité (%) (*)	Indice de peroxyde mEq O ₂ /kg (*)	Cires mg/kg (**)	2 glyceril monopalmitate (%)	Stigmasta-diène mg/kg (1)	Différence ECN42 HPLC - et ECN42 Calcul théorique	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Évaluation organoleptique Médiane du défaut (Md) (*)	Évaluation organoleptique Médiane du fruité (Mf) (*)
1. Huile d'olive vierge extra	Σ EMAG + EEAG \leq 75 mg/kg ou 75 mg/kg $<$ Σ EMAG + EEAG \leq 150 mg/kg et (EEAG/EMAG) \leq 1,5	\leq 0,8	\leq 20	\leq 250	\leq 0,9 si % Acide palmitique total \leq 14 % \leq 1,0 si % Acide palmitique total $>$ 14 %	\leq 0,10	\leq 0,2	\leq 2,50	\leq 0,22	\leq 0,01	Md = 0	Mf $>$ 0
2. Huile d'olive vierge	—	\leq 2,0	\leq 20	\leq 250	\leq 0,9 si % Acide palmitique total \leq 14 % \leq 1,0 si % Acide palmitique total $>$ 14 %	\leq 0,10	\leq 0,2	\leq 2,60	\leq 0,25	\leq 0,01	Md \leq 3,5	Mf $>$ 0
3. Huile d'olive lampante	—	$>$ 2,0	—	\leq 300 (3)	\leq 0,9 si % Acide palmitique total \leq 14 % \leq 1,1 si % Acide palmitique total $>$ 14 %	\leq 0,50	\leq 0,3	—	—	—	Md $>$ 3,5 (2)	—
4. Huile d'olive raffinée	—	\leq 0,3	\leq 5	\leq 350	\leq 0,9 si % Acide palmitique total \leq 14 % \leq 1,1 si % Acide palmitique total $>$ 14 %	—	\leq 0,3	—	\leq 1,10	\leq 0,16	—	—

▼ **M23**

Catégorie	Esters méthyliques d'acides gras (EMAG) et esters éthyliques d'acides gras (EEAG)	Acidité (%) (*)	Indice de peroxyde mEq O ₂ /kg (*)	Cires mg/kg (**)	2 glyceril monopalmitate (%)	Stigmastadiène mg/kg (1)	Différence ECN42 HPLC - et ECN42 Calcul théorique	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Évaluation organoleptique Médiane du défaut (Md) (*)	Évaluation organoleptique Médiane du fruité (Mf) (*)
5. Huile d'olive composée d'huile d'olive raffinée et d'huile d'olive	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 si % Acide palmitique total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % Acide palmitique total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Huile de grignons d'olive brute	—	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Huile de grignons d'olive raffinée	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Huile de grignons d'olive	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Somme des isomères qui pourrait (ou pas) être séparés par colonne capillaire.

(2) ► **C3** Ou lorsque la médiane des défauts est inférieure ou égale à 3,5 et la médiane du fruité est égale à 0. ◀

(3) Les huiles avec une teneur en cires comprise entre 300mg/kg et 350 mg/kg sont considérées comme huile d'olive lampante si les alcools aliphatiques totaux sont inférieurs ou égaux à 350 mg/kg ou si le pourcentage en erythrodiol et uvaol est inférieur ou égal à 3,5.

(4) Les huiles avec une teneur en cires comprise entre 300mg/kg et 350 mg/kg sont considérées comme huile de grignons d'olive brute si les alcools aliphatiques totaux sont supérieur à 350 mg/kg et si le pourcentage en erythrodiol et uvaol est supérieur à 3,5,

▼ M23

Catégorie	Teneur en acides ⁽¹⁾						Sommes des Isomères trans-oléiques (%)	Sommes des Isomères Translinoléiques+translinoléiques (%)	Composition des stérols						Stérols totaux (mg/kg)	Erythrodiol et uvaol (%) (**)
	Myristique (%)	Linoléique (%)	Arachidique (%)	Eicosanoïque (%)	Bénoïque (%)	Lignocé-rique (%)			Cholé-sterol (%)	Brassi-castérol (%)	Campe-sterol (%)	Stigmastérol (%)	Bétasito-sterol (%) ⁽²⁾	Delta-7-Stigma-sterol (%)		
1. Huile d'olive vierge extra	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Huile d'olive vierge	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Huile d'olive lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Huile d'olive raffinée	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Huile d'olive composée d'huile d'olive raffinée et d'huile d'olive vierge	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Huile de grignons d'olive brute	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾
7. Huile de grignons d'olive raffinée	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Huile de grignons d'olive	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Teneur en autres acides gras (%): palmitique: 7,5 - 20,0; palmitoléique: 0,3 - 3,5; heptadécanoïque: ≤ 0,3; heptadécénoïque: ≤ 0,3; stéarique: 0,5 - 5,0; oléique: 55,0 - 83,0; linoléique: 3,5 - 21,0

⁽²⁾ Somme de : Delta-5-23-Stigmastadiénol+Clérostérol+Béta-Sitostérol+Sitostanol+Delta-5-Avéna-sterol+Delta-5-24-Stigmastadiénol.

⁽³⁾ Les huiles avec une teneur en cires comprise entre 300mg/kg et 350 mg/kg sont considérées comme huile d'olive lampante si les alcools aliphatiques totaux sont inférieurs ou égaux à 350 mg/kg ou si le pourcentage en erythrodiol et uvaol est inférieur ou égal à 3,5.

⁽⁴⁾ Les huiles avec une teneur en cires comprise entre 300mg/kg et 350 mg/kg sont considérées comme huile de grignons d'olive brute si les alcools aliphatiques totaux sont supérieurs à 350 mg/kg et si le pourcentage en erythrodiol et uvaol est supérieur à 3,5.

Notes:

- Les résultats des analyses doivent être exprimés en indiquant le même nombre de décimales que ceux prévus pour chaque caractéristique.
Le dernier chiffre doit être augmenté d'une unité si le chiffre suivant dépasse 4.
- Il suffit qu'une seule caractéristique ne soit pas conforme aux valeurs indiquées pour que l'huile soit changée de catégorie ou déclarée non conforme quant à sa pureté.
- Les caractéristiques indiquées avec astérisque (*), se référant à la qualité de l'huile, impliquent que:
— pour l'huile d'olive lampante, les limites y relatives peuvent ne pas être simultanément respectées;
— pour les huiles d'olive vierges, le non-respect d'au moins une de ces limites comporte un changement de catégorie, tout en restant classées dans une des catégories des huiles d'olive vierges.
- Les caractéristiques indiquées avec deux astérisques (**), se référant à la qualité de l'huile, impliquent que, pour toutes les huiles de grignons d'olive, les limites y relatives peuvent ne pas être simultanément respectées.

▼ **M20***ANNEXE I bis***Échantillonnage d'huile d'olive ou d'huile de grignons d'olive livrées en emballages immédiats de 100 litres au maximum**

La présente méthode d'échantillonnage s'applique pour des livraisons d'huiles d'olive ou de grignons d'olive de 125 000 litres au maximum, conditionnées en emballages immédiats de 100 litres au maximum.

Lorsque la livraison comporte plus de 125 000 litres, elle est subdivisée en lots de quantités égales ou inférieures à 125 000 litres. Lorsque la livraison est inférieure à 125 000 litres, elle constitue un lot. La méthode s'applique alors à chaque lot.

En fonction de la taille du lot, il est établi le nombre minimal de prélèvements élémentaires, conformément au tableau figurant au point 1.

L'importance du prélèvement élémentaire est établie en fonction de la capacité des emballages immédiats, selon le tableau prévu au point 2.1.

On entend par «livraison», «prélèvement élémentaire» et «échantillon de laboratoire», les définitions visées à la norme EN ISO 5555.

On entend par «lot» un ensemble d'unités de vente qui sont produites, fabriquées et conditionnées dans des circonstances telles que l'huile contenue dans chacune de ces unités de vente est considérée comme homogène pour toutes les caractéristiques analytiques.

1. NOMBRE DE PRÉLÈVEMENTS ÉLÉMENTAIRES

Le nombre minimal de prélèvements élémentaires est établi en fonction de la taille du lot conformément au tableau suivant:

Taille du lot inférieure à (en litres)	Nombre minimal de prélèvements élémentaires
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125 000	5

Les emballages immédiats d'un même prélèvement élémentaire doivent être choisis de façon contiguë dans le lot.

En cas de doute, l'État membre augmente le nombre de prélèvements élémentaires à effectuer.

2. CONTENU D'UN PRÉLÈVEMENT ÉLÉMENTAIRE**2.1. Chaque prélèvement élémentaire est constitué par:**

Dans le cas où les emballages immédiats ont une capacité:	Le prélèvement élémentaire porte sur l'huile de:
a) Supérieure ou égale à 5 litres	a) 3 emballages immédiats
b) Supérieure ou égale à 3 litres et inférieure à 5 litres	b) 3 emballages immédiats
c) Supérieure ou égale à 2 litres et inférieure à 3 litres	c) 3 emballages immédiats
d) Supérieure ou égale à 1 litre et inférieure à 2 litres	d) 6 emballages immédiats
e) Supérieure ou égale à 0,75 litre et inférieure à 1 litre	e) 6 emballages immédiats
f) Inférieure à 0,75 litre	f) 3 fois l'huile du nombre minimal d'emballages dont la capacité totale dépasse 1,5 litre

▼M20

2.2. **Les prélèvements élémentaires devront être maintenus dans les emballages immédiats jusqu'au moment des analyses. L'huile des prélèvements élémentaires est en suite, le cas échéant, subdivisée en trois échantillons de laboratoire en vue d'effectuer:**

- a) les analyses visées aux annexes II, III, IX et X;
- b) l'analyse visée à l'annexe XII;
- c) les autres analyses.

2.3. **Les emballages qui constituent un prélèvement élémentaire sont subdivisés selon les procédures de contrôle prévues par les législations nationales.**

3. ANALYSES ET RÉSULTATS

a) Chacun des prélèvements élémentaires visés au point 1 est subdivisé en échantillons de laboratoire, conformément au point 2.5 de la norme EN ISO 5555, pour être soumis aux analyses suivantes:

- détermination des acides gras libres, visée à l'article 2, paragraphe 1, premier tiret,
- détermination de l'indice de peroxydes, visée à l'article 2, paragraphe 1, deuxième tiret,
- analyse spectrophotométrique, visée à l'article 2, paragraphe 1, huitième tiret,
- composition en acides gras, visée à l'article 2, paragraphe 1, neuvième tiret.

b) Dans le cas où, pour au moins un des prélèvements élémentaires pris sur le même lot, les résultats d'analyses visées au point a) ne sont pas tous conformes aux caractéristiques de la catégorie d'huile déclarée, l'ensemble du lot concerné est déclaré non conforme.

Dans le cas où, pour chacun des prélèvements élémentaires pris sur le même lot, les résultats des analyses visées au point a) ne sont pas tous homogènes, compte tenu des caractéristiques de répétabilité des méthodes concernées, l'ensemble du lot est déclaré non homogène et chaque prélèvement élémentaire doit être soumis aux autres analyses requises. Dans le cas contraire, un seul des prélèvements élémentaires sur ledit lot est soumis aux autres analyses requises.

c) Dans les cas où un des résultats d'analyses visées au point b), deuxième alinéa, n'est pas conforme aux caractéristiques de la catégorie d'huile déclarée, l'ensemble du lot concerné est déclaré non conforme.

Dans le cas où tous les résultats des analyses visées au point b), deuxième alinéa, sont conformes aux caractéristiques de la catégorie d'huile déclarée, l'ensemble du lot concerné est déclaré conforme.

▼ M20*ANNEXE I ter***SCHÉMA DÉCISIONNEL POUR LA VÉRIFICATION DE LA CONFORMITÉ D'UN ÉCHANTILLON D'HUILE D'OLIVE AVEC LA CATÉGORIE DÉCLARÉE**

L'analyse de la conformité d'une huile d'olive ou de grignons d'olive à la catégorie déclarée peut s'effectuer:

- a) soit en réalisant dans n'importe quel ordre les analyses prévues pour vérifier le respect des caractéristiques stipulées à l'annexe I;
- b) soit en réalisant dans l'ordre indiqué par le schéma décisionnel les analyses qui y sont prévues, jusqu'à aboutir à une des décisions mentionnées par ledit schéma décisionnel.

Les analyses relatives aux contaminants nécessaires pour vérifier la conformité avec les normes de la Communauté européenne sont à réaliser indépendamment.

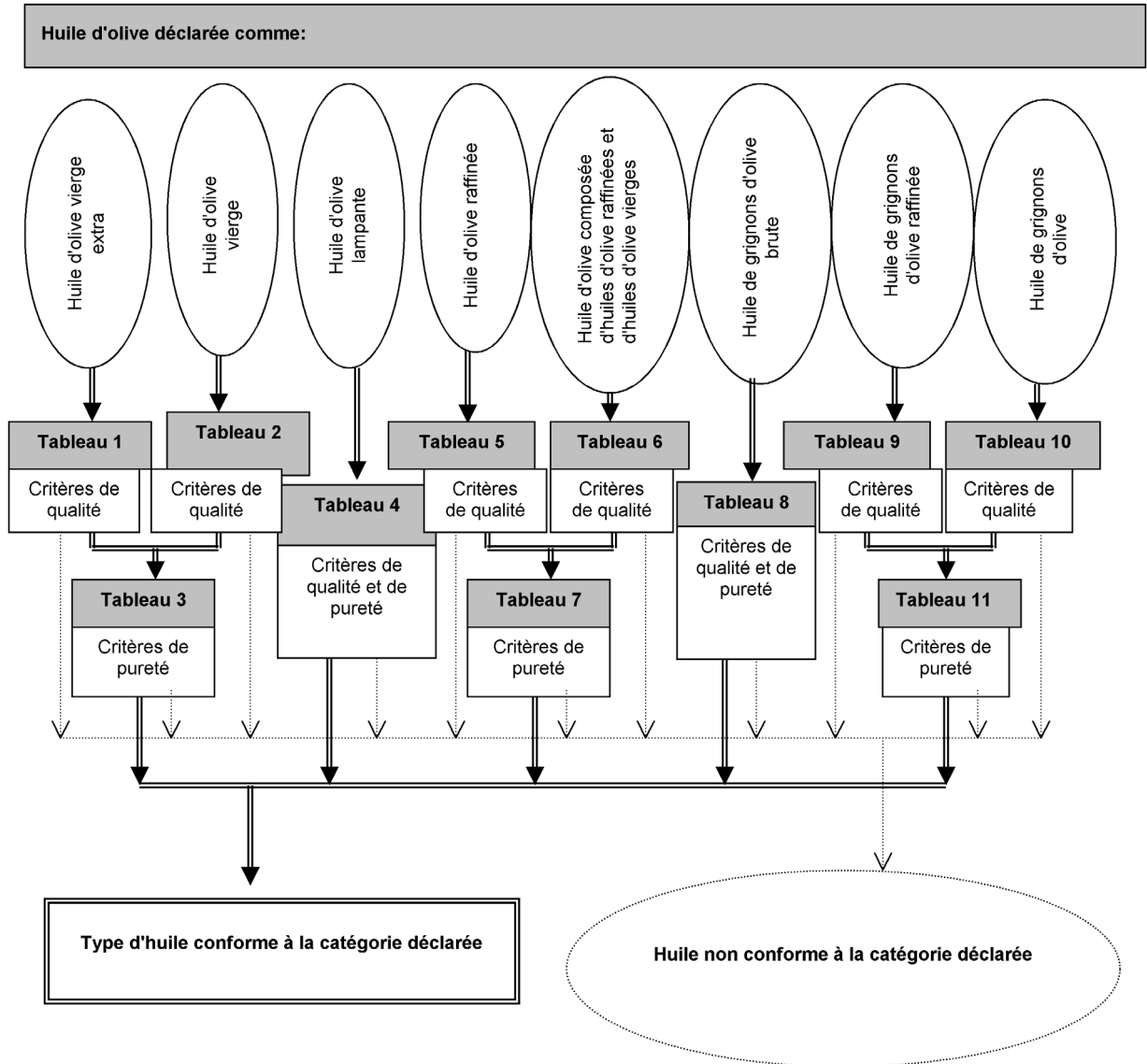
Le schéma décisionnel s'applique à toutes les catégories d'huiles d'olive et de grignons d'olive. Il se compose de tableaux numérotés de 1 à 11 qui doivent être abordés en fonction de la déclaration de la catégorie de l'huile en présence selon l'ordre prévu dans le tableau général.

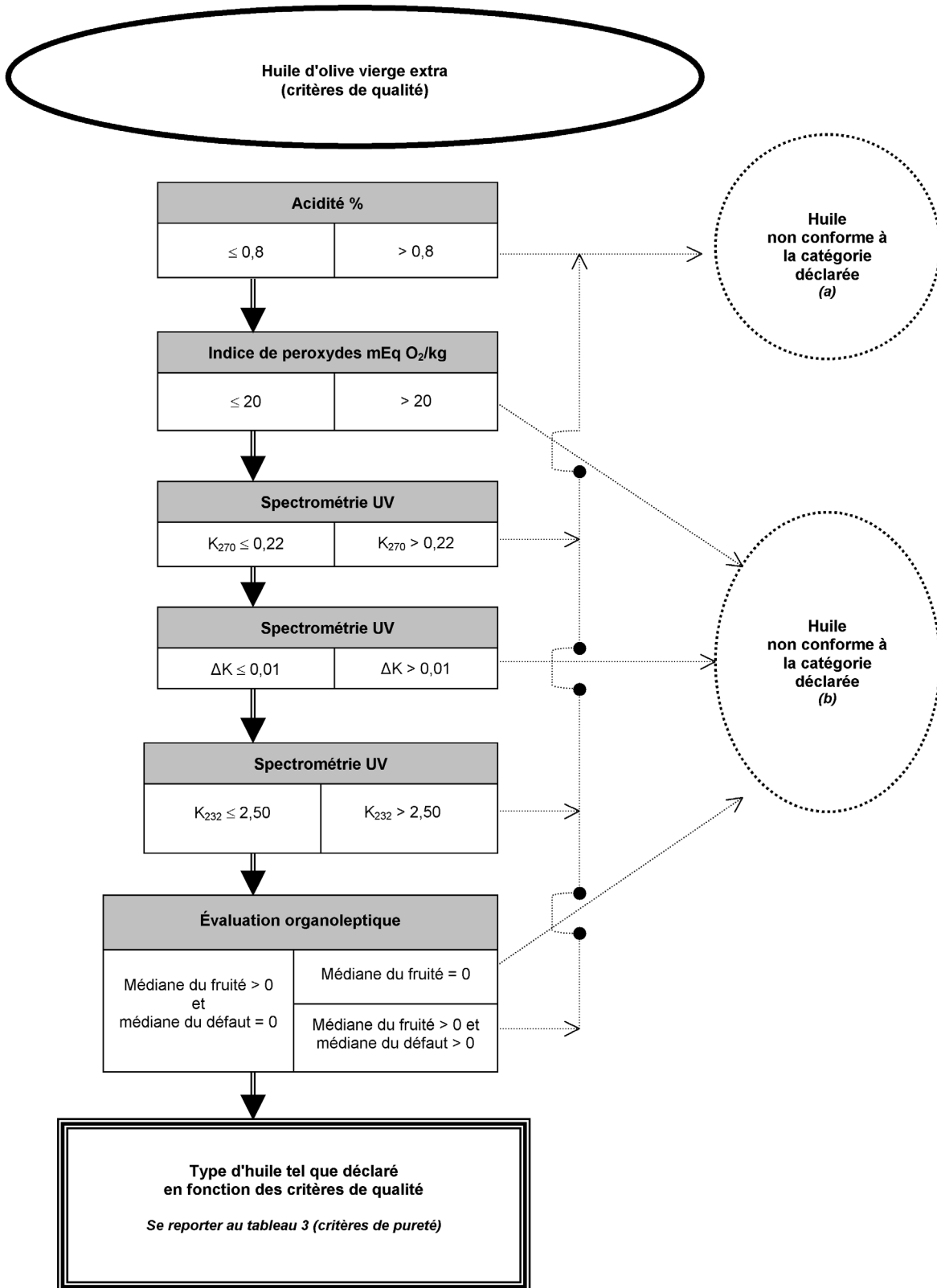
Pour la lecture du tableau général au tableau 11:

- La double ligne (=) indique le chemin à suivre en cas de conformité (réponse positive) avec les conditions prévues dans la case qui précède. La ligne pointillée (...) indique à l'inverse le chemin à suivre en cas de non conformité.
- Les titres des cases figurant dans les tableaux 1 à 11 se réfèrent aux analyses prévues par le présent règlement selon les correspondances mentionnées à l'appendice 1 de la présente annexe.
- Les lettres de renvoi figurant dans les cercles de décision négative des tableaux 1 à 11 correspondent à des informations indicatives mentionnées à l'appendice 2 de la présente annexe. Elles n'impliquent pas par elles-mêmes l'obligation de poursuivre les analyses ou la certitude des présomptions mentionnées.

▼ **M20**

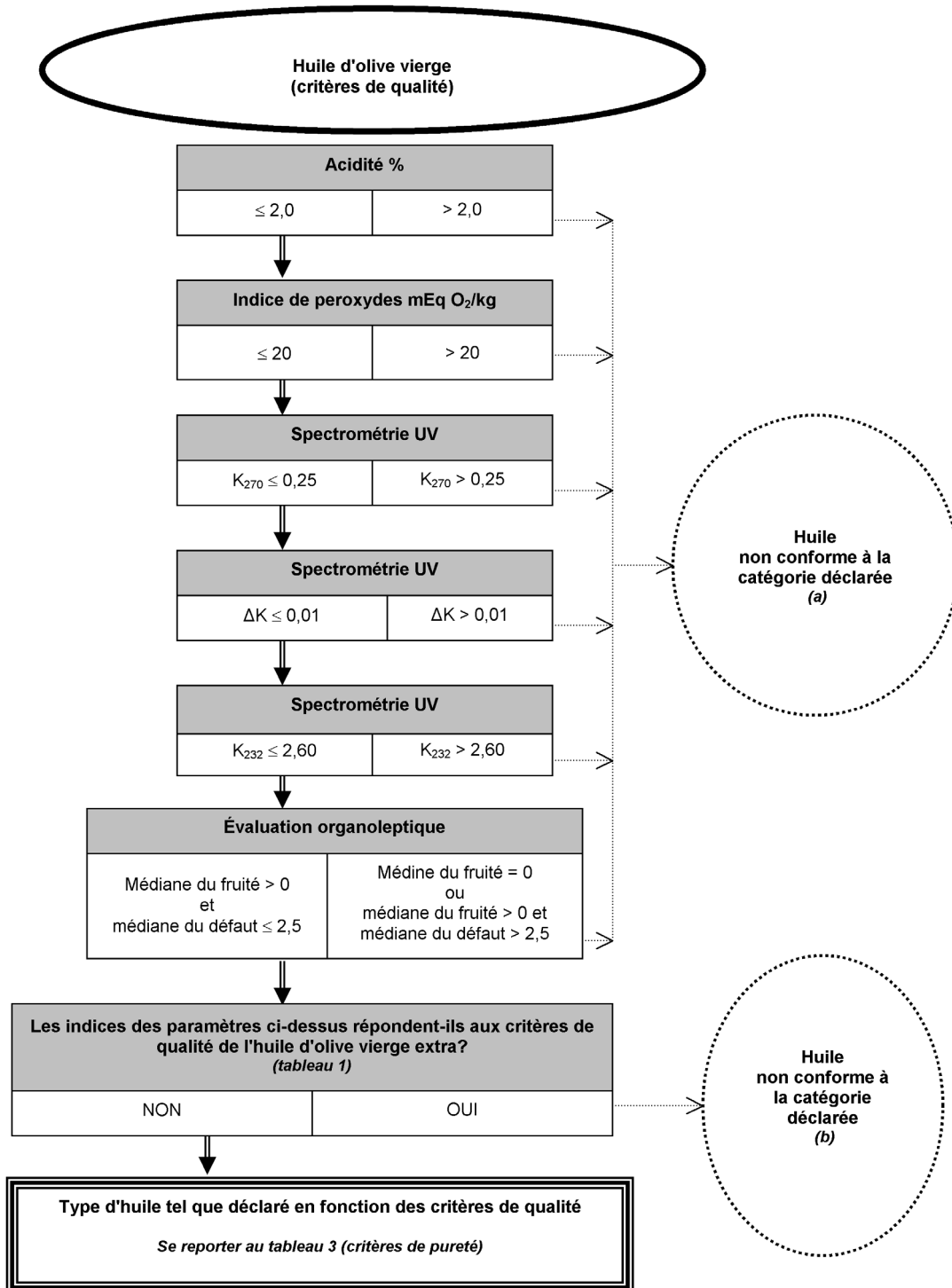
Tableau général



▼ **M20****Tableau 1**

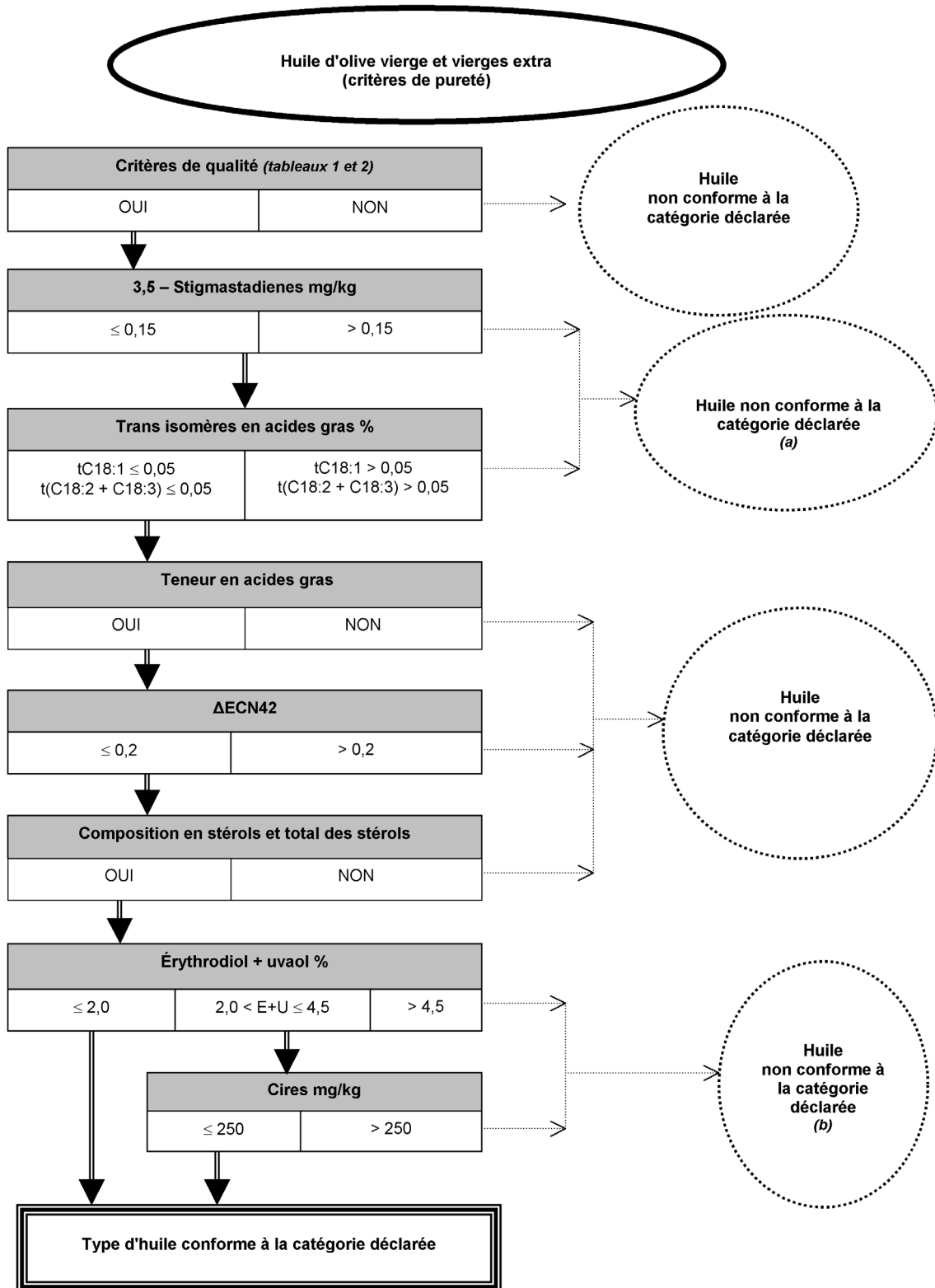
▼ **M20**

Tableau 2



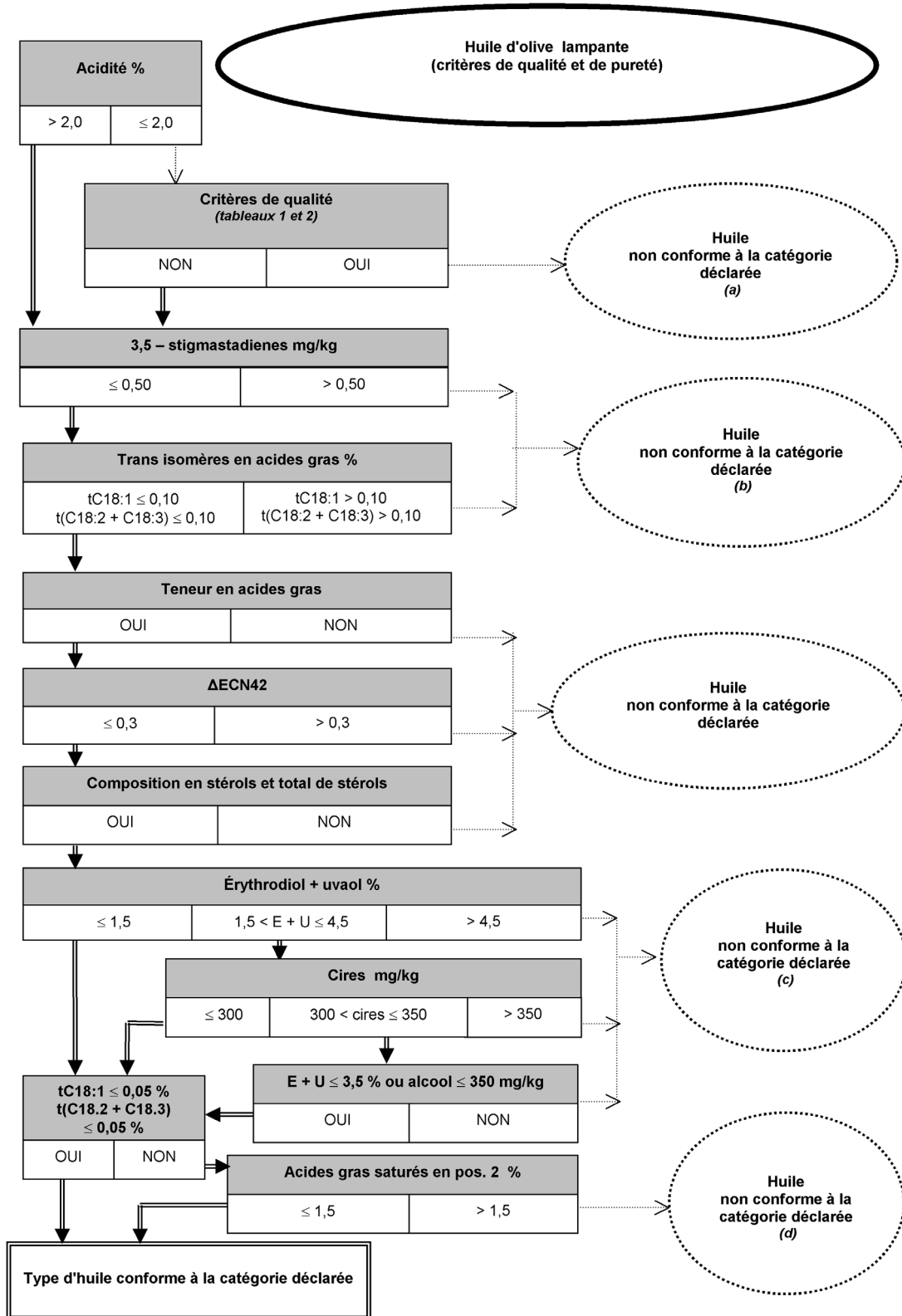
▼ M20

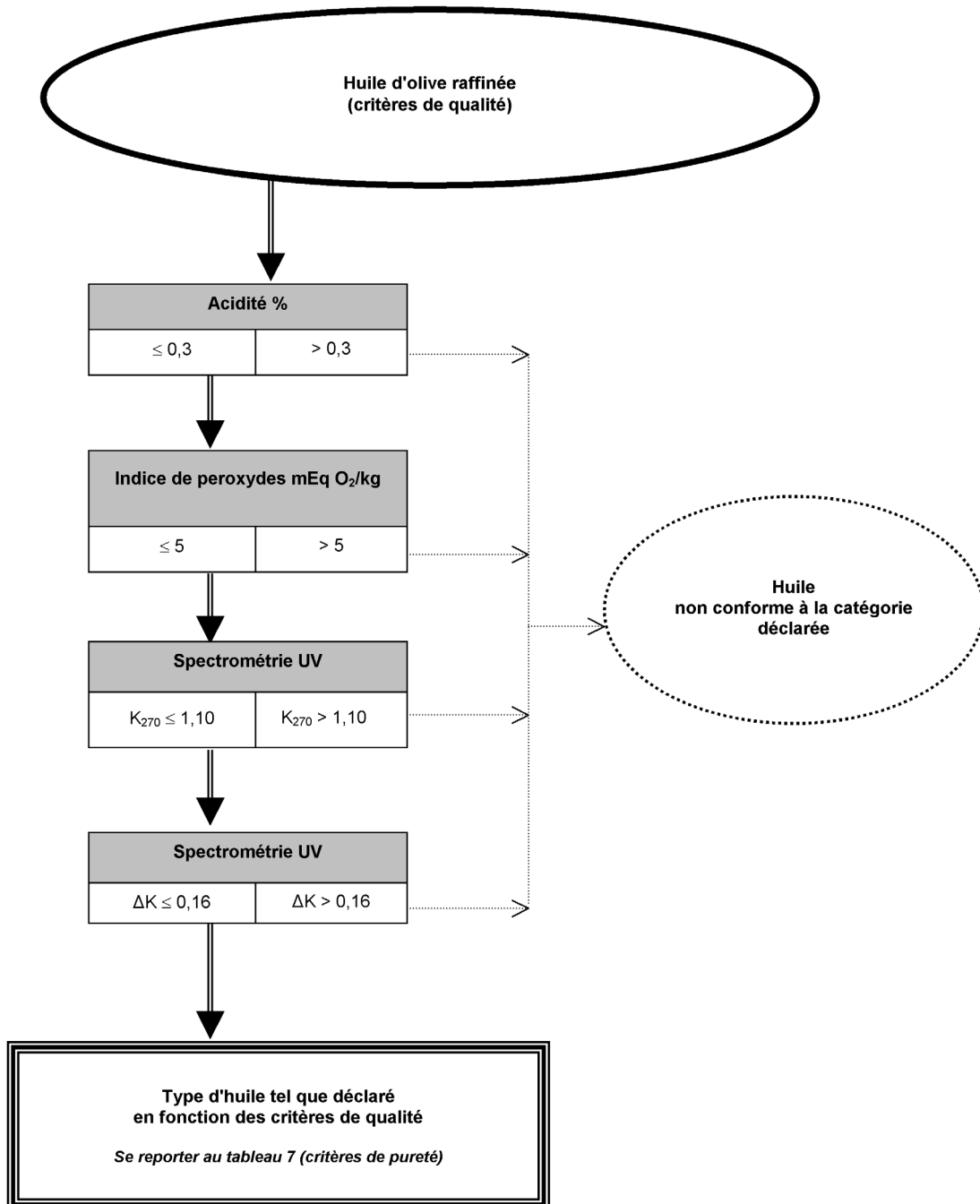
Tableau 3



▼ M20

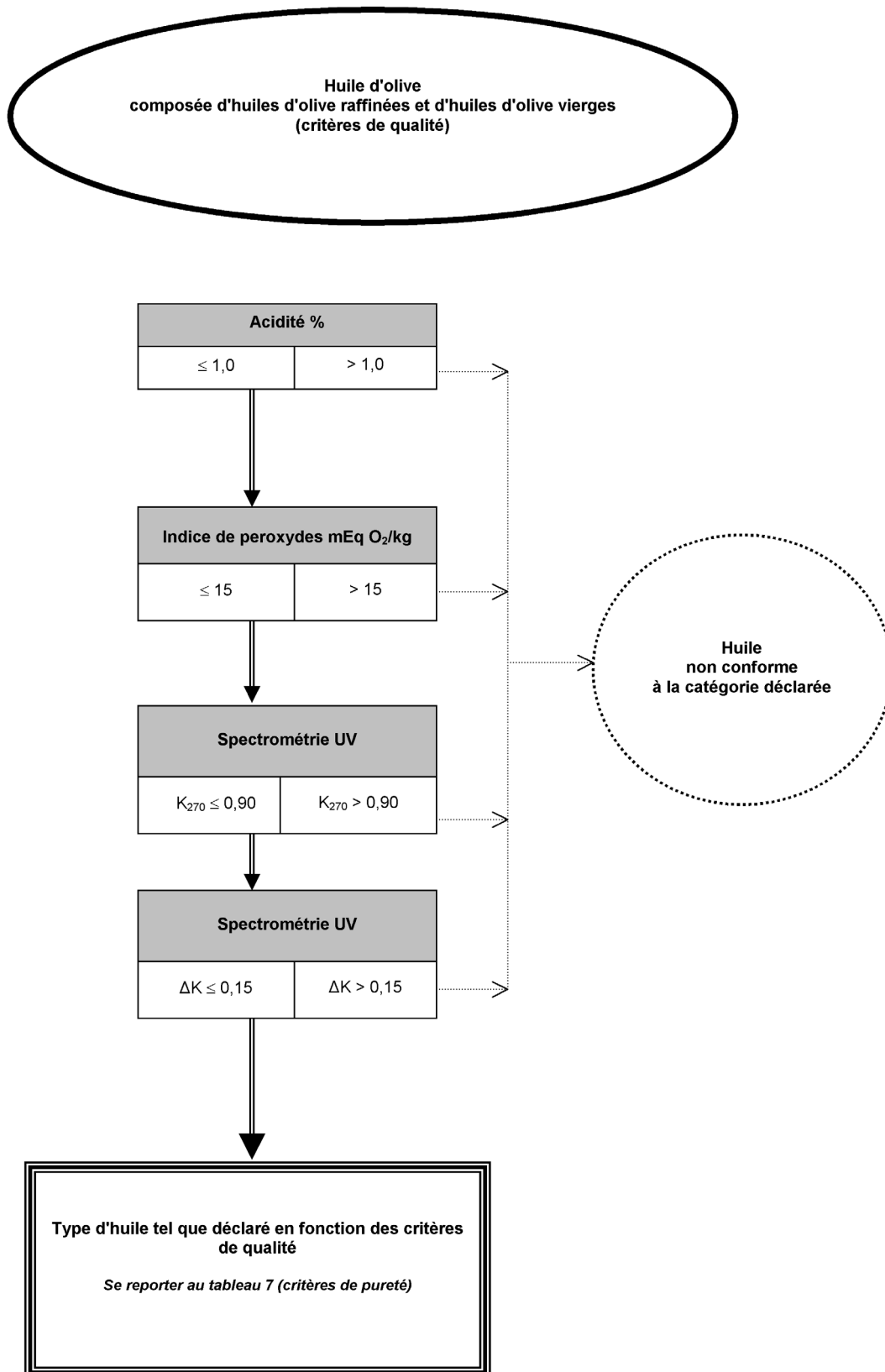
Tableau 4



▼ **M20****Tableau 5**

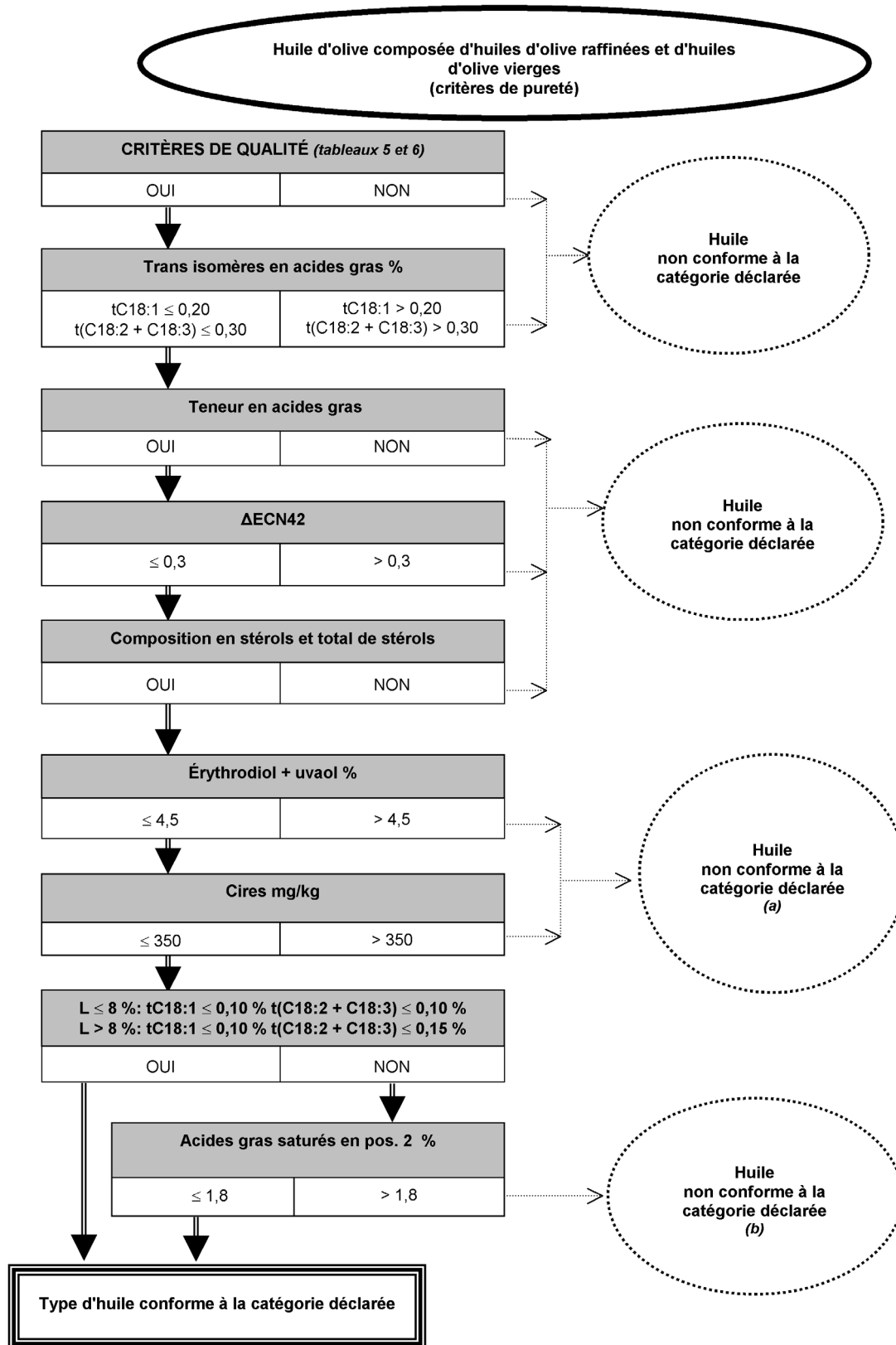
▼ M20

Tableau 6



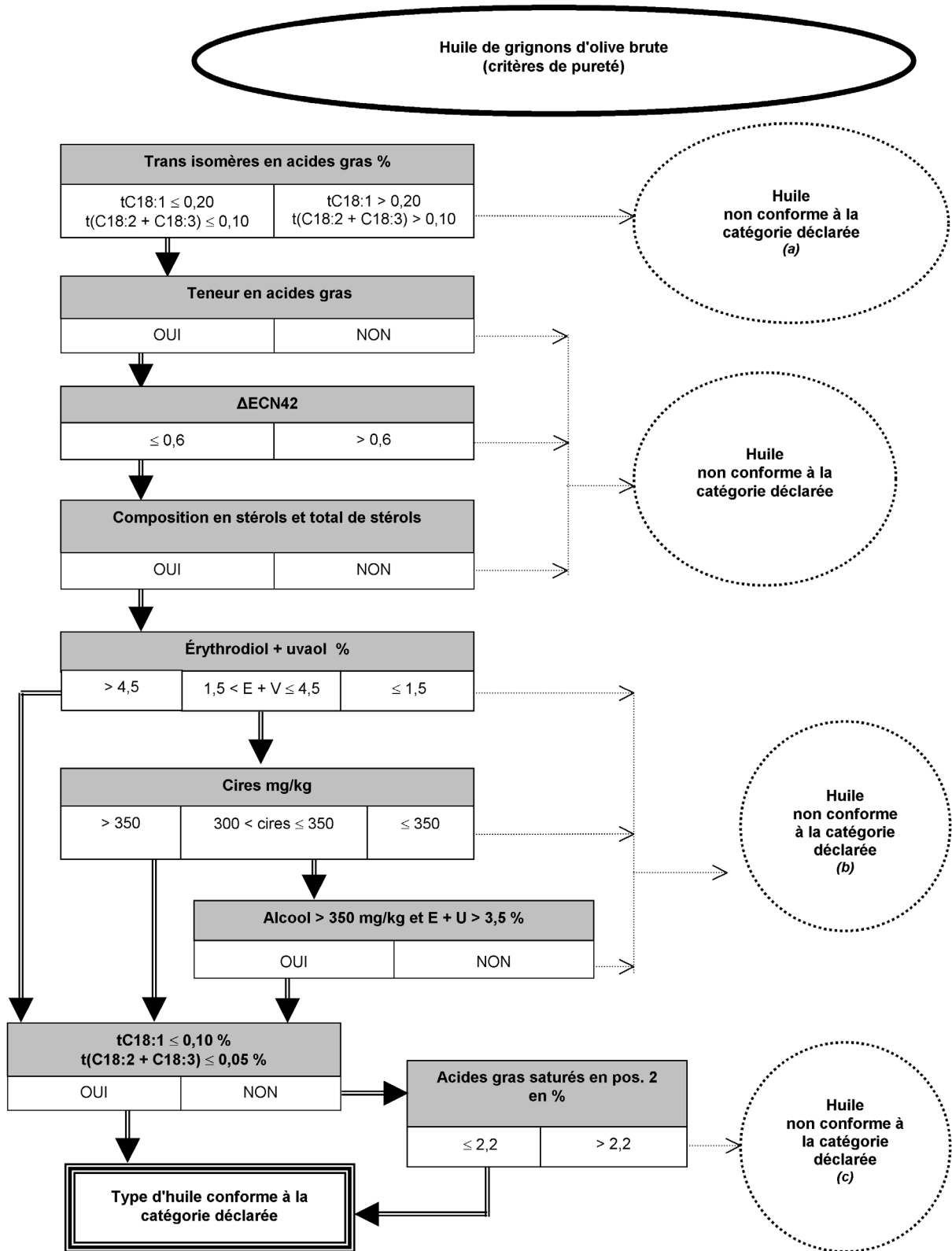
▼ **M20**

Tableau 7



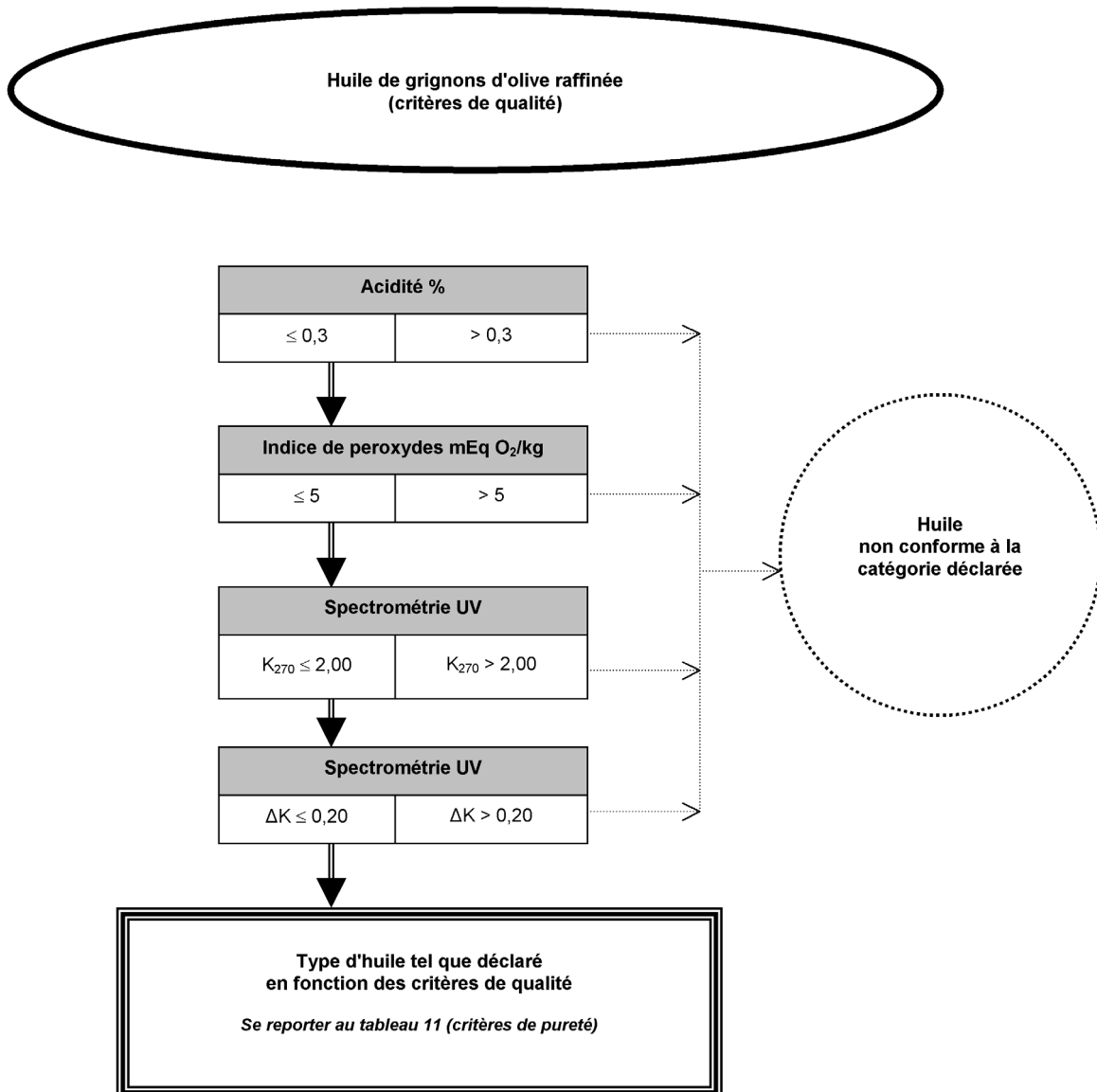
▼ M20

Tableau 8



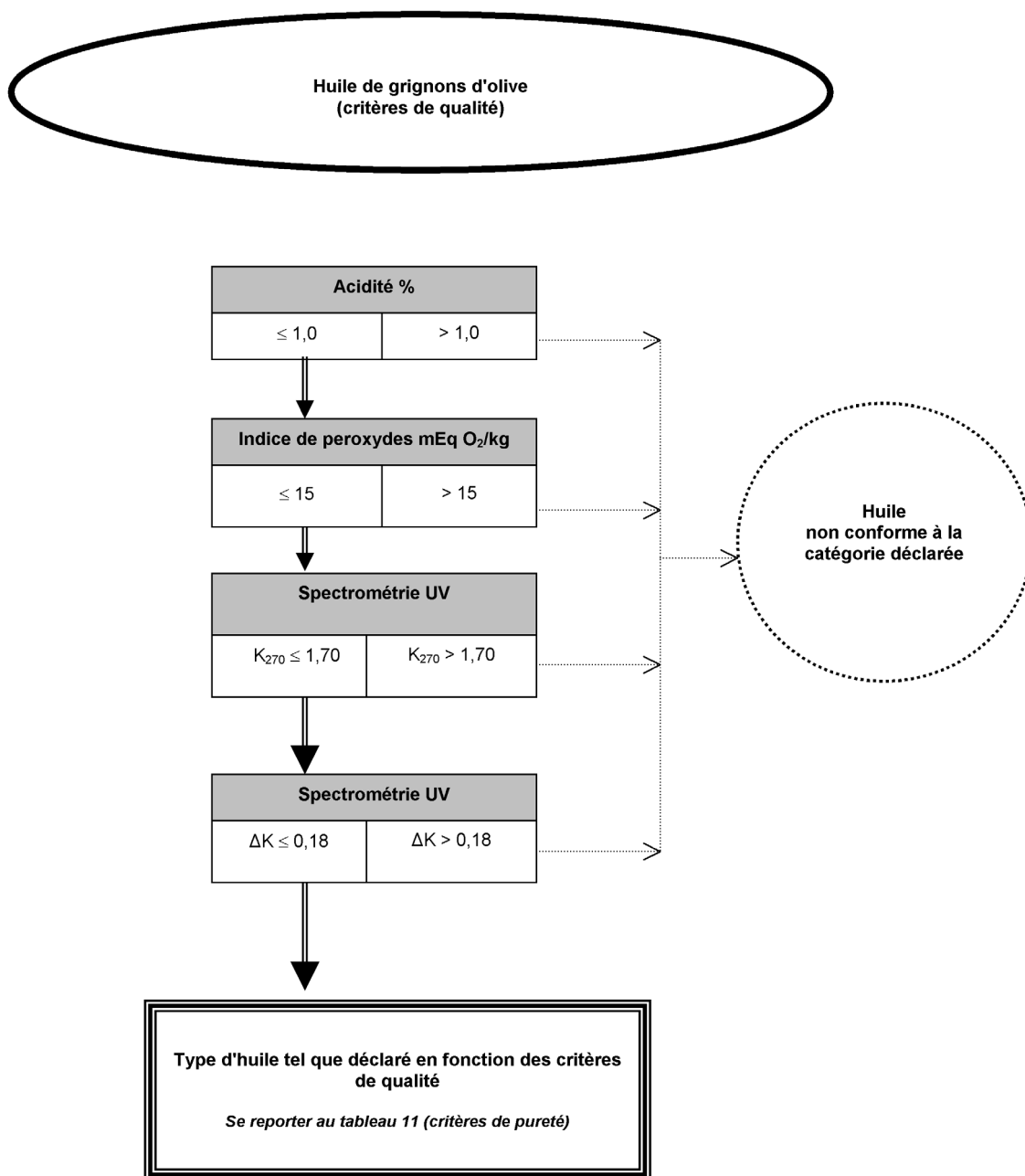
▼ **M20**

Tableau 9



▼ **M20**

Tableau 10



▼ M20*Appendice 1***Correspondance entre les annexes du présent règlement et les analyses visées par le schéma décisionnel****▼ M21**

- | | | |
|-----------|-----------|---|
| — Acidité | Annexe II | Détermination des acides gras libres, méthode à froid |
|-----------|-----------|---|

▼ M20

- | | | |
|--|---------------------------------|---|
| — Indice de peroxydes | Annexe III | Détermination de l'indice de peroxyde |
| — Spectrophotométrie dans l'ultraviolet | Annexe IX | Analyse spectrophotométrique |
| — Évaluation organoleptique | Annexe XII | Évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge |
| — Stigmasta-3,5-diène | Annexe XVII | Méthode de détermination des stigmas-tadiènes dans les huiles végétales |
| — Isomères trans des acides gras | Annexe X a et

Annexe X b | Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras

Préparation des esters méthyliques d'acides gras |
| — Composition en acides gras | Annexe X a et

Annexe X b | Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras

Préparation des esters méthyliques d'acides gras |
| — ΔECN42 | Annexe XVIII | Détermination de la composition des triglycérides à ECN42 (différence entre composition réelle et composition théorique) |
| — Composition en stérols et stérols totaux | Annexe V | Détermination de la composition et du contenu en stérols au moyen de la chromatographie en phase gazeuse avec colonne capillaire |
| — Érythrodiol et uvaol | Annexe VI | Détermination de la composition en érythrodiol et en uvaol |
| — Cires | Annexe IV | Détermination de la teneur en cires au moyen de la chromatographie en phase gazeuse avec colonne capillaire |
| — Alcools aliphatiques | Annexe XIX | Détermination du contenu en alcools aliphatiques au moyen de la chromatographie en phase gazeuse avec colonne capillaire |
-
- | | | |
|-------------------------------------|------------|--|
| — Acides gras saturés en position 2 | Annexe VII | Détermination du pourcentage du 2-glycérid monopalmitate |
|-------------------------------------|------------|--|

▼ M20*Appendice 2***Tableau 1**

- a) Voir huile d'olive vierge ou lampante (critères de qualité, *tableau 2*, ou critères de qualité et de pureté, *tableau 4*)
- b) Voir huile d'olive lampante (critères de qualité et de pureté, *tableau 4*)

Tableau 2

- a) Voir huile d'olive lampante (critères de qualité et de pureté, *tableau 4*)
- b) Voir huile d'olive vierge extra (critères de qualité, *tableau 1*)

Tableau 3

- a) Présence d'huile raffinée (olive ou autres)
- b) Présence d'huile de grignons d'olive

Tableau 4

- a) Voir huile d'olive vierge extra et huile d'olive vierge (critères de qualité, *tableaux 1 et 2*)
- b) Présence d'huile raffinée (olive ou autres)
- c) Présence d'huile de grignons d'olive
- d) Présence d'huiles estérifiées

Tableau 7

- a) Présence d'huile de grignons d'olive
- b) Présence d'huiles estérifiées

Tableau 8

- a) Présence d'huile raffinée (olive ou autres)
- b) Voir huile d'olive lampante (critères de qualité et de pureté, *tableau 4*)
- c) Présence d'huiles estérifiées

Tableau 11

- a) Présence d'huiles estérifiées

▼B

ANNEXE II

▼M21**DÉTERMINATION DES ACIDES GRAS LIBRES, MÉTHODE À FROID****▼B**

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 phénolphtaléine (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 butyrate 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. Phénolphtaléine, 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:

▼B

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.

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:

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

▼B

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.

▼B

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.

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 exède 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:

$$IP = \frac{V \times T \times 1000}{m}$$

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.

▼ **M21***ANNEXE IV***DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN CIRES AU MOYEN DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE AVEC COLONNE CAPILLAIRE****1. OBJET**

Cette méthode décrit un procédé pour la détermination de la teneur en cires des huiles d'olive. Les cires sont séparées en fonction du nombre d'atomes de carbone. La méthode peut être employée notamment pour différencier l'huile d'olive de pression de celle d'extraction (huile de grignons).

2. PRINCIPE

La matière grasse, additionnée d'un étalon interne approprié, est fractionnée par chromatographie sur colonne de gel de silice hydraté; la fraction éluée en premier dans les conditions de l'essai (à polarité inférieure à celle des triglycérides) est récupérée puis analysée directement par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

3. MATÉRIEL**3.1. Erlenmeyer de 25 ml.****3.2. Colonne en verre pour chromatographie en phase gazeuse, diamètre intérieur 15,0 mm, hauteur 30 à 40 cm, équipée d'un robinet.****3.3. Appareil de chromatographie en phase gazeuse approprié pour le fonctionnement avec colonne capillaire, équipé d'un système d'introduction directe dans la colonne, constitué par:****3.3.1. Chambre à thermostat pour les colonnes, équipée d'un programmeur de température.****3.3.2. Injecteur à froid pour introduction directe dans la colonne.****3.3.3. Révélateur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur.****3.3.4. Enregistreur-intégrateur approprié pour le fonctionnement avec le convertisseur-amplificateur (3.3.3), vitesse de réponse non supérieure à 1 seconde et vitesse de déroulement du papier variable. (Il est également possible d'utiliser des systèmes informatisés qui prévoient l'acquisition des données de chromatographie en phase gazeuse au moyen d'un PC.)****3.3.5. Colonne capillaire en verre ou silice fondue, longueur 8 à 12 m, diamètre intérieur 0,25 à 0,32 mm, recouverte à l'intérieur de liquide de répartition, à l'épaisseur uniforme comprise entre 0,10 et 0,30 µm. (Liquides de répartition adaptés à l'emploi, du type SE52 ou SE 54 dans le commerce.)****3.4. Microseringue pour introduction directe dans la colonne de 10 µl, équipée d'une aiguille cémentée.****3.5. Vibreur électrique.****3.6. Évaporateur rotatif.****3.7. Four à moufle.****3.8. Balance analytique garantissant une précision de la mesure de ± 0,1 mg.****3.9. Verrerie normale de laboratoire.****4. RÉACTIFS****4.1. Gel de silice d'une granulométrie comprise entre 60 et 200 µm.**

Le gel de silice doit être placé dans le four à 500 °C pendant au moins 4 heures. Après refroidissement, y ajouter 2 % d'eau par rapport à la quantité de gel de silice prélevée. Agiter convenablement afin d'homogénéiser la masse. Conserver à l'obscurité pendant au moins 12 heures avant emploi.

▼ M21

- 4.2. n-hexane, pour chromatographie.
- 4.3. Éther éthylique, pour chromatographie.
- 4.4. n-Heptane, pour chromatographie.
- 4.5. Solution étalon d'arachidate laurique, solution à 0,1 % (m/V) dans l'hexane (étalon interne). (Il est également possible d'utiliser du palmitate de palmityle ou du stéarate de myristyle)
 - 4.5.1. Soudan 1 (1-phenyl-azo-2-naphthol).
- 4.6. Gaz vecteur: hydrogène ou hélium pur, pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.7. Gaz auxiliaires:
 - hydrogène pur, pour chromatographie en phase gazeuse,
 - air pur, pour chromatographie en phase gazeuse.

5. MODE OPÉRATOIRE**5.1. Préparation de la colonne chromatographique**

Suspendre 15 g de gel de silice (4.1) dans le n-hexane (4.2) et l'introduire dans la colonne (3.2). Après tassement spontané, le compléter à l'aide d'un agitateur électrique (3.5) pour rendre la couche chromatographique plus homogène. Percoler 30 ml de n-hexane afin d'éliminer les impuretés éventuelles. Peser exactement à l'aide de la balance (3.8) 500 mg de l'échantillon dans l'Erlenmeyer de 25 ml (3.1), ajouter la quantité appropriée d'étalon interne (4.5), en fonction du contenu présumé de cires. Par exemple, ajouter 0,1 mg d'arachidate laurique dans le cas de l'huile d'olive et 0,25 à 0,5 mg dans le cas de l'huile de grignons. Transférer l'échantillon ainsi préparé dans la colonne chromatographique à l'aide de deux portions de 2 ml chacune de n-hexane (4.2).

Laisser s'écouler le solvant jusqu'à 1 mm au-dessus du niveau supérieur de l'absorbant puis percoler 70 ml de n-hexane supplémentaires afin d'éliminer les n-alcanes naturellement présents. Commencer alors l'élution chromatographique en recueillant 180 ml du mélange n-hexane/éther éthylique, rapport 99:1, tout en respectant un débit d'environ 15 gouttes toutes les 10 secondes. L'élution de l'échantillon doit être effectuée à une température ambiante de 22 °C ± 4.

Notes: — Le mélange n-hexane/éther éthylique (99:1) doit être préparé chaque jour.

- Pour contrôler visuellement l'élution correcte des cires, il est possible d'ajouter à l'échantillon en solution 100 µl de soudan à 1 % dans le mélange d'élution. Le colorant ayant une rétention intermédiaire entre les cires et les triglycérides, lorsque la coloration atteint le fond de la colonne chromatographique, il convient de suspendre l'élution car toutes les cires ont été éluées.

La fraction ainsi obtenue est séchée dans l'évaporateur rotatif (3.6) jusqu'à élimination pratiquement totale du solvant. Les deux derniers ml du solvant sont éliminés à l'aide d'un faible courant d'azote; ajouter ensuite 2-4 ml de n-heptane

5.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse**5.2.1. Opérations préliminaires**

Installer la colonne dans le chromatographe en phase gazeuse (3.3), en branchant le terminal d'entrée au système «on-column» et le terminal de sortie au révélateur. Effectuer les contrôles généraux de l'appareillage de chromatographie en phase gazeuse (tenue des circuits des gaz, efficacité du révélateur et du système d'enregistrement, etc.).

▼ **M21**

Si la colonne est utilisée pour la première fois, il est recommandé de procéder à son conditionnement. Laisser s'écouler un léger débit de gaz à travers la colonne, puis allumer l'appareillage de chromatographie en phase gazeuse. Chauffer graduellement jusqu'à atteindre, au bout d'environ 4 heures, une température de 350 °C. Maintenir cette température pendant au moins 2 heures, puis procéder au réglage de l'appareillage aux conditions de fonctionnement [réglage du débit des gaz, allumage de la flamme, branchement à l'enregistreur électronique (3.3.4), réglage de la température de la chambre pour la colonne, du révélateur, etc.] et enregistrer le signal à une sensibilité au moins 2 fois supérieure à celle prévue pour l'exécution de l'analyse. Le tracé de la ligne de base doit être linéaire, exempt de pics de toute nature, et ne doit pas présenter de déviation.

Une déviation rectiligne négative indique une tenue imparfaite des connexions de la colonne; une déviation positive indique un conditionnement insuffisant de la colonne.

5.2.2. *Choix des conditions opératoires*

D'une manière générale, les conditions opératoires à observer sont les suivantes:

— température de la colonne:

	20 °C/ minute		5 °C/ minute		20 °C/ minute	
au départ 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— température du révélateur: 350 °C,

— quantité de matière injectée: 1 µl de la solution (2-4 ml) de n-heptane,

— gaz vecteur: hélium ou hydrogène à la vitesse linéaire optimale pour le gaz sélectionné (voir appendice),

— sensibilité instrumentale: en mesure de répondre aux conditions ci-dessous:

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, de manière à obtenir une séparation de toutes les cires, une résolution satisfaisante des pics (voir figure) et un temps de rétention de l'étalon interne C₃₂ qui doit être de 18 ± 3 minutes. Le pic des cires le plus représentatif doit avoir mesuré au moins 60 % du fond de l'échelle.

Les paramètres d'intégration des pics doivent être déterminés de façon à obtenir une évaluation correcte des aires des pics pris en considération.

Note: Vu la température finale élevée, on admet une dérive positive qui de doit pas être supérieure à 10 % du fonds de l'échelle.

5.3. **Exécution de l'analyse**

Prélever 1 µl de la solution à l'aide de la microsiringue de 10 µl; retirer le piston de la siringue de manière à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille dans le dispositif d'injection et, après 1-2 secondes, injecter rapidement; au bout d'environ 5 secondes, extraire lentement l'aiguille.

Effectuer l'enregistrement jusqu'à élution complète des cires.

▼ M21

La ligne de base doit toujours répondre aux conditions requises.

5.4. Identification des pics

L'identification des différents pics doit être effectuée à partir des temps de rétention et par comparaison avec des mélanges de cires aux temps de rétention connus, analysés dans les mêmes conditions.

La figure ci-après représente un chromatogramme des cires d'une huile d'olive vierge.

5.5. Évaluation quantitative

Procéder au calcul des aires des pics de l'étalon interne et des esters aliphatiques de C₄₀ à C₄₆ à l'aide de l'intégrateur.

Calculer la teneur en cires de chacun des esters, en mg/kg de matière grasse, par la formule:

$$\text{ester, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

Où:

A_x = aire du pic de chaque ester, en millimètres carrés;

A_s = aire du pic de l'étalon interne, en millimètres carrés;

m_s = masse d'étalon interne ajoutée, en milligrammes;

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

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

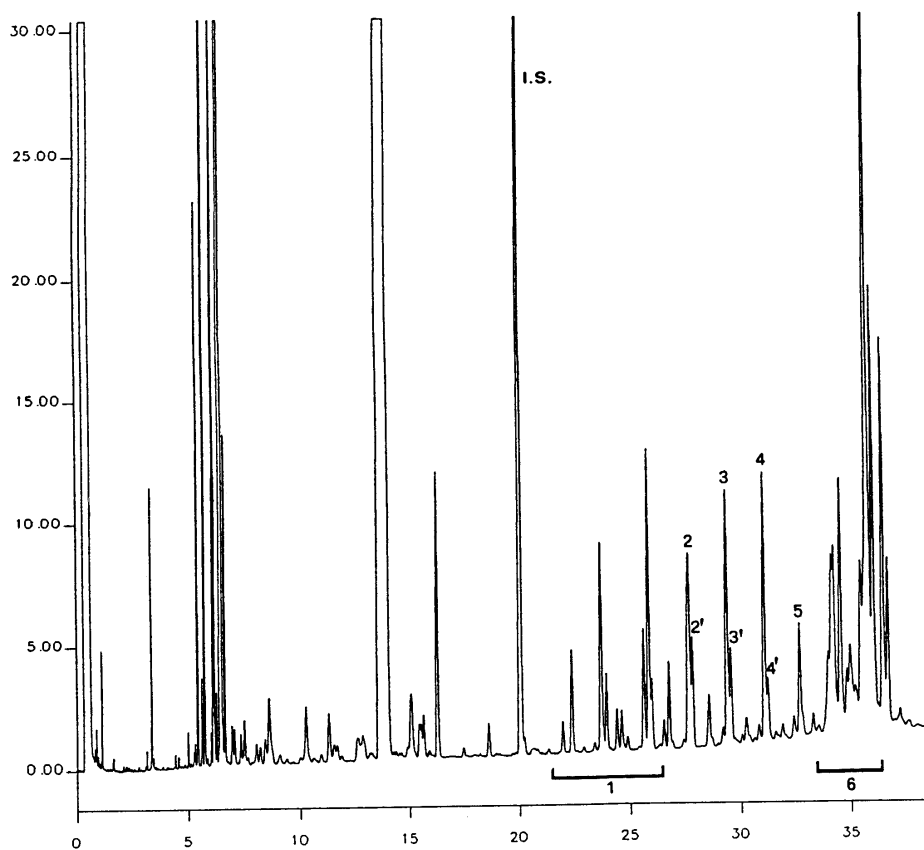
Indiquer la somme des teneurs des différentes cires de C₄₀ à C₄₆, en mg/kg de matière grasse (ppm).

Note: Les composants à quantifier font référence aux pics à nombre de carbone paires compris entre les esters C₄₀ et C₄₆, selon l'exemple de chromatogramme des cires de l'huile d'olive reporté dans la figure ci-après. Si l'ester C₄₆ apparaît en double, il est conseillé, pour l'identifier, d'analyser la fraction des cires d'une huile de grignons d'olive où le pic C₄₆ est facilement identifiable car nettement majoritaire.

Les résultats sont exprimés avec une décimale.

▼M21

Figure
Chromatogramme des cires d'une huile d'olive (1)



Légende:

- I.S. = Arachidate laurique
- 1. = Esters diterpéniques
- 2 + 2' = Esters C₄₀
- 3 + 3' = Esters C₄₂
- 4 + 4' = Esters C₄₄
- 5. = Esters C₄₆
- 6. = Esters stérols et alcool triterpéniques

(1) Après l'éluion des esters des stérols, le tracé chromatographique ne doit pas présenter de pics significatifs (triglycérides).

▼ M21*APPENDICE***Détermination de la vitesse linéaire du gaz**

Injecter de 1 à 3 μl de méthane (ou propane) dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, après son réglage aux conditions opératoires normales. Chronométrer le temps employé par le gaz pour parcourir la colonne, à partir du moment de son injection jusqu'au moment de la sortie du pic (t_M).

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

▼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. ►**CI** 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 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 ►**CI** microlitres ◀ avec aiguille cémentée.

▼B

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.
- 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 contenaient.
- 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.

▼B

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 choléstanol, 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 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 distillé 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.

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 les 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.

▼B

- 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 microseringue de ►**CI** 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.

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-hexaméthylsilazane-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.

▼B

- 5.3.2. Boucher le tube, agiter soigneusement (sans retourner) jusqu'à complète solubilisation des stérils. 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,
- ► **CI** 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,

▼B

- 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 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 siringue 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 stigmastadiérol, chlérosterol, β -sitostérol, sitostanol, Δ 5-avénastérol, 5,24 stigmastadiérol, Δ 7-stigmastérol, 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:

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

▼ B

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.

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.

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

A_x = aire du pic x.

$\sum A$ = 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

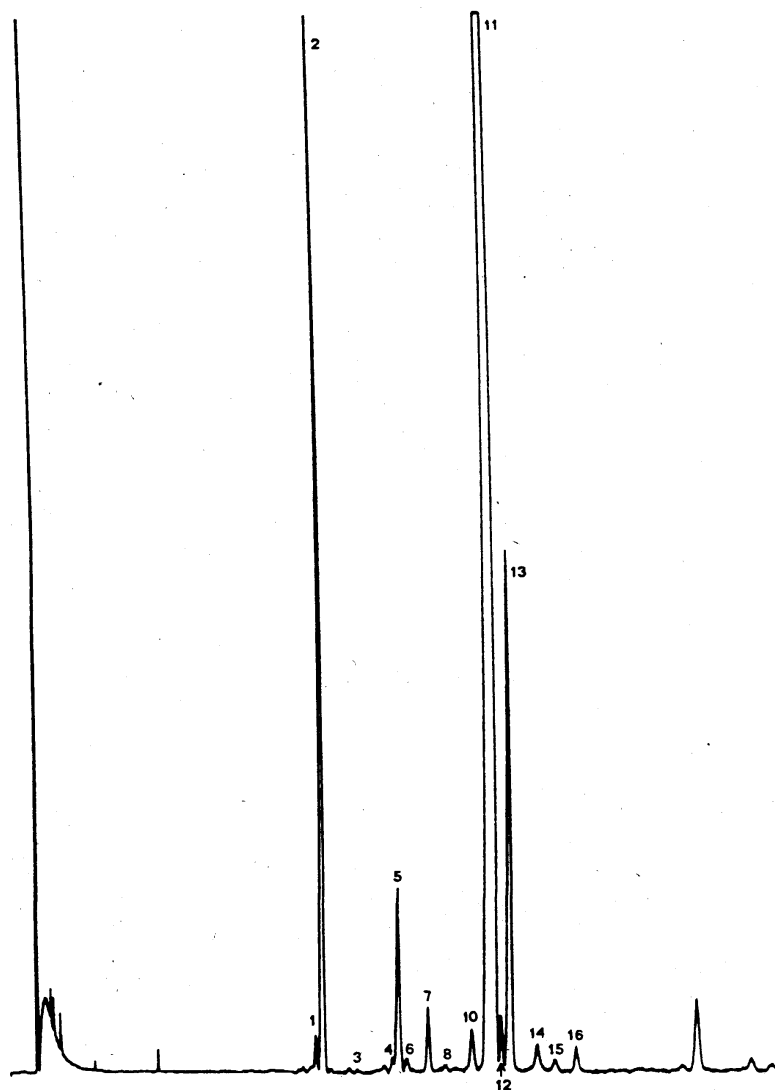
Temps de rétention relatifs des stérols

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 \blacktriangleleft -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-éthylidén-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-stigmasténol	[24S,R]-24-éthyl- C1 Δ -7-cholestène \blacktriangleleft -3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avénestérol	[24Z]-24-éthylidén- Δ -7-cholestène-3 β -ol	1,16	1,16

▼B

Figure 1

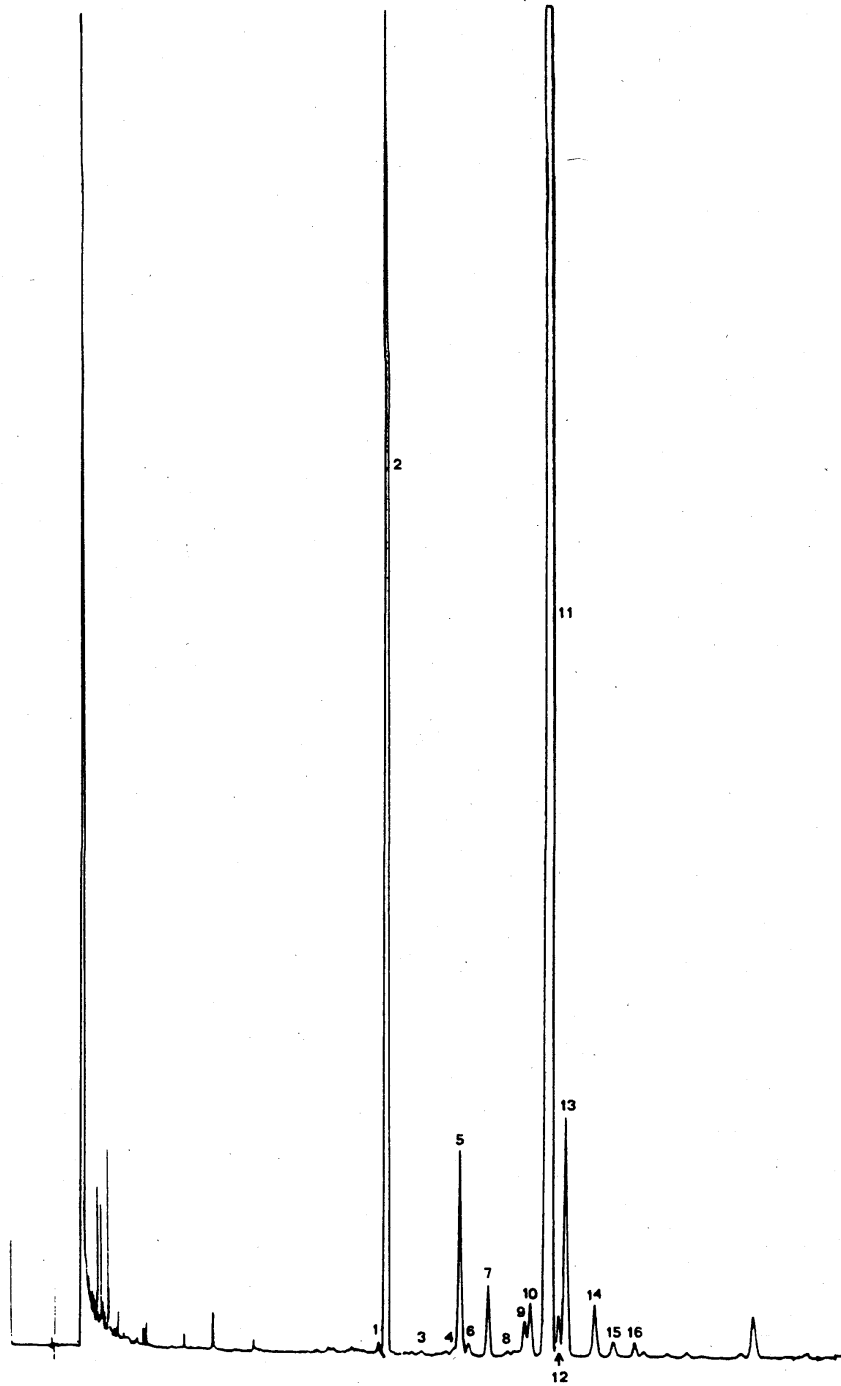
Chromatographie en phase gazeuse de la fraction stérolique d'une huile d'olive brute



▼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.

▼B

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.

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**

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

où:

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

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

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

Indiquer le résultat avec une décimale.

▼ **M21***ANNEXE VII***DÉTERMINATION DU POURCENTAGE DU 2-GLYCÉRIL MONOPALMITATE****1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION**

Cette méthode décrit la procédure analytique pour la détermination du pourcentage d'acide palmitique en position 2 des triglycérides au moyen de l'évaluation du 2-glycéril monopalmitate.

Cette méthode est applicable aux huiles végétales liquides à température ambiante (20 °C).

2. PRINCIPE

Après préparation, l'échantillon d'huile est soumis à l'action de la lipase pancréatique: une hydrolyse partielle et spécifique dans les positions 1 et 3 de la molécule de triglycéride entraîne l'apparition des monoglycérides en position 2. Le pourcentage de 2-glycéril monopalmitate dans la fraction monoglycéridique est déterminé, après silylation, par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

3. APPAREILLAGE ET MATÉRIEL COURANT

- 3.1. Erlenmeyer, 25 ml
- 3.2. Bêchers 100, 250 et 300 ml
- 3.3. Colonne en verre pour chromatographie, diamètre intérieur 21-23 mm, longueur 400 mm, équipée d'une plaque en verre fritté et d'un robinet
- 3.4. Éprouvettes graduées de 10, 50, 100 et 200 ml
- 3.5. Ballons de 100 et 250 ml
- 3.6. Évaporateur rotatif
- 3.7. Tubes de centrifugeuse à fond conique de 10 ml, avec bouchon rodé
- 3.8. Centrifugeuse pour des tubes de 10 et 100 ml
- 3.9. Thermostat permettant de maintenir la température à $40 \pm 0,5$ °C
- 3.10. Pipettes graduées de 1 et 2 ml
- 3.11. Seringue hypodermique de 1 ml
- 3.12. Microseringue de 100 µl
- 3.13. Entonnoir, 1 000 ml
- 3.14. Chromatographe en phase gazeuse pour colonnes capillaires, équipé d'un dispositif d'injection «on-column» à froid pour l'introduction directe de l'échantillon dans la colonne et d'un four susceptible de maintenir la température choisie à 1 °C près
- 3.15. Injecteur «on-column» à froid pour l'introduction directe de l'échantillon dans la colonne
- 3.16. Détecteur à ionisation de flamme et électromètre
- 3.17. Enregistreur-intégrateur adapté à l'électromètre avec une vitesse de réponse non supérieure à 1 seconde et une vitesse variable de déroulement du papier
- 3.18. Colonne capillaire en verre ou en silice fondue de 8 à 12 mètres, d'un diamètre intérieur de 0,25 à 0,32 mm, recouverte de methylpolysiloxane ou de phényl méthylpolysiloxane 5 %, d'une épaisseur de 0,10-0,30 µm, pouvant être utilisée à 370 °C

▼ M21

- 3.19. Microseringue de 10 µl munie d'une aiguille cémentée, d'au moins 7,5 cm de long, pour injection directe sur colonne

4. RÉACTIFS

- 4.1. Gel de silice ayant une granulométrie comprise entre 0,063 et 0,200 mm (70/280 mesh), préparé comme suit: mettre le gel de silice dans une capsule de porcelaine, sécher à l'étuve à 160 °C pendant 4 heures, puis laisser refroidir à température ambiante dans un dessiccateur. Ajouter un volume d'eau équivalent à 5 % du poids du gel de silice, comme suit: dans un Erlenmeyer de 500 ml, peser 152 g de gel de silice et ajouter 8 g d'eau distillée, boucher et agiter délicatement pour obtenir une répartition uniforme de l'eau. Laisser reposer au moins 12 heures avant l'emploi.
- 4.2. n-hexane (pour chromatographie)
- 4.3. Isopropanol
- 4.4. Isopropanol, solution aqueuse 1/1 (V/V)
- 4.5. Lipase pancréatique. La lipase utilisée doit avoir une activité comprise entre 2,0 et 10 unités de lipase par mg. (Il existe dans le commerce des lipases pancréatiques ayant une activité comprise entre 2 et 10 unités par mg d'enzyme.)
- 4.6. Solution tampon de tris-hydroxy-méthylaminométhane: solution aqueuse 1 M amenée jusqu'à pH 8 (contrôle potentiométrique) par du HCl concentré (1/1 V/V)
- 4.7. Cholate de sodium, qualité enzymatique, solution aqueuse à 0,1 % (cette solution doit être utilisée dans les 15 jours suivant sa préparation)
- 4.8. Chlorure de calcium, solution aqueuse à 22 %
- 4.9. Éther diéthylique pour chromatographie
- 4.10. Solvant de développement: mélange n-hexane/éther diéthylique (87/13) (V/V)
- 4.11. Hydroxyde de sodium, solution à 12 % en poids
- 4.12. Phénolphtaléine, solution à 1 % dans l'éthanol
- 4.13. Gaz vecteur: hydrogène ou hélium, pour chromatographie en phase gazeuse
- 4.14. Gaz auxiliaires: hydrogène, à 99 % minimum, exempt d'humidité et de substances organiques; et air, pour chromatographie en phase gazeuse de la même pureté
- 4.15. Réactif de silanisation: mélange pyridine/hexamethyldisilazane, triméthylchlorosilane 9/3/1 (V/V/V). (Des solutions prêtes à l'emploi existent dans le commerce. D'autres réactifs de silylation peuvent être employés, notamment bis-triméthylsilyl trifluoracetamide + 1 % triméthylchlorosilane, dilués avec un volume identique de pyridine anhydre.)
- 4.16. Échantillons de référence: monoglycérides purs ou mélanges de monoglycérides ayant une composition en pourcentage connue similaire à celle de l'échantillon.

5. PROCÉDURE**5.1. Préparation de l'échantillon**

- 5.1.1. Les huiles ayant une acidité libre inférieure à 3 % n'ont pas besoin d'être neutralisées avant la chromatographie sur colonne de gel de silice. Les huiles ayant une acidité libre supérieure à 3 % devront être soumises à la neutralisation conformément au point 5.1.1.1.

▼ M21

- 5.1.1.1. Dans l'entonnoir de 1 000 ml (3.13), verser 50 g d'huile et 200 ml de n-hexane. Ajouter 100 ml d'isopropanol et une quantité de la solution d'hydroxyde de sodium à 12 % (4.11) correspondant à l'acidité libre de l'huile majorée de 5 %. Agiter énergiquement pendant une minute. Ajouter 100 ml d'eau distillée, agiter de nouveau et laisser reposer.

Après décantation, éliminer la couche inférieure contenant les savons. Éliminer les éventuelles couches intermédiaires (mucilage et substances insolubles). Laver la solution hexanique de l'huile neutralisée avec des portions successives de 50-60 ml de la solution isopropanol/eau 1/1 (V/V) (4.4) jusqu'à disparition de la coloration rosée de la phénolphthaléine.

Éliminer la plus grande partie de l'hexane par distillation sous vide (utiliser par exemple un évaporateur rotatif) et transférer l'huile dans un ballon de 100 ml (3.5). Sécher l'huile sous vide jusqu'à élimination totale du solvant.

À la fin de cette opération, l'acidité de l'huile doit être inférieure à 0,5 %.

- 5.1.2. Introduire 1,0 g d'huile préparée comme indiqué ci-dessus dans un Erlenmeyer de 25 ml (3.1) et dissoudre dans 10 ml de mélange de développement (4.10). Laisser reposer la solution pendant au moins 15 minutes avant la chromatographie sur colonne de gel de silice.

Si la solution est trouble, la centrifuger pour garantir des conditions optimales pour la chromatographie. (Des cartouches de gel de silice SPE de 500 mg prêtes à l'emploi peuvent être utilisées.)

5.1.3. *Préparation de la colonne chromatographique*

Verser dans la colonne (3.3) environ 30 ml du solvant de développement (4.10), introduire un morceau de coton dans la partie inférieure de la colonne à l'aide d'une baguette de verre; presser pour éliminer l'air.

Dans un bécher, préparer une suspension de 25 g de gel de silice (4.1) dans environ 80 ml de solvant de développement et le verser dans la colonne à l'aide d'un entonnoir.

Vérifier que tout le gel de silice a été introduit dans la colonne; laver avec le solvant de développement (4.10), ouvrir le robinet et laisser le niveau du liquide atteindre environ 2 mm au-dessus du niveau supérieur du gel de silice.

5.1.4. *Chromatographie sur colonne*

Dans un Erlenmeyer de 25 ml (3.1), peser exactement 1,0 g d'échantillon préparé conformément au point 5.1.

Dissoudre l'échantillon dans 10 ml de solvant de développement (4.10). Verser la solution dans la colonne chromatographique préparée conformément au point 5.1.3. Éviter de remuer la surface de la colonne.

Ouvrir le robinet et laisser s'écouler la solution de l'échantillon jusqu'à ce qu'elle atteigne le niveau du gel de silice. Développer avec 150 ml de solvant de développement. Ajuster le débit à 2 ml/min (de façon à ce que 150 ml s'écoulent dans la colonne en 60-70 minutes environ).

Récupérer l'éluat dans un ballon de 250 ml préalablement taré. Évaporer le solvant sous vide et enlever les dernières traces de celui-ci sous un courant d'azote.

Peser le ballon et calculer l'extrait récupéré

▼ M21

[En cas d'utilisation de cartouches SPE de silice prêtes à l'emploi, procéder comme suit: introduire 1 ml de solution (5.1.2) dans les cartouches préalablement préparées avec 3 ml de n-hexane.

Après percolation de la solution, développer avec 4 ml de n-hexane/éther diéthylique 9/1 (V/V).

Récupérer l'éluat dans un tube de 10 ml et le soumettre à évaporation sous un courant d'azote jusqu'à siccité.

Soumettre le résidu sec à l'action de la lipase pancréatique (5.2). Il est fondamental de vérifier la composition en acide gras avant et après passage sur cartouche SPE].

5.2. Hydrolyse par la lipase pancréatique

5.2.1. Dans le tube de la centrifugeuse, peser 0,1 g de l'huile préparée conformément au point 5.1. Ajouter 2 ml de solution tampon (4.6), 0,5 ml de la solution de cholate de sodium (4.7) et 0,2 ml de la solution de chlorure de calcium, en agitant bien après chaque addition. Fermer le tube par le bouchon rodé et le placer dans le thermostat à $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2. Ajouter 20 mg de lipase, agiter soigneusement (en évitant de mouiller le bouchon) et mettre le tube dans le thermostat pendant exactement 2 minutes, puis le retirer, agiter énergiquement pendant 1 minute exactement et laisser refroidir.

5.2.3. Ajouter 1 ml d'éther diéthylique, boucher et agiter énergiquement, puis centrifuger et transférer la solution d'éther dans un tube propre et sec, à l'aide d'une microseringue.

5.3. Préparation des dérivés silanisés et de la chromatographie en phase gazeuse

5.3.1. À l'aide d'une microseringue, introduire 100 µl de solution (5.2.3) dans un tube à fond conique de 10 ml.

5.3.2. Éliminer le solvant sous un léger courant d'azote, ajouter 200 µl de réactif de silanisation (4.15), boucher le tube et laisser reposer pendant 20 minutes.

5.3.3. Après 20 minutes, ajouter 1 à 5 ml de n-hexane (en fonction des conditions chromatographiques): la solution résultant est prête pour la chromatographie en phase gazeuse.

5.4. Chromatographie en phase gazeuse

Les conditions d'opération sont les suivantes:

— température de l'injecteur (injecteur «on-column») inférieure à la température d'ébullition du solvant (68 °C),

— température du détecteur: 350 °C,

— température de la colonne: programmation de la température du four: 60 °C pendant 1 minute, en augmentant de 15 °C par minute jusqu'à 180 °C, puis de 5 °C par minute jusqu'à 340 °C, puis 340 °C pendant 13 minutes,

— gaz vecteur: hydrogène ou hélium, réglé à la vitesse linéaire adéquate en vue d'obtenir la résolution reflétée dans la figure 1. Le temps de rétention du triglycéride C₅₄ doit être de 40 ± 5 minutes (voir figure 2). (Les conditions d'opérations indiquées ci-dessus sont proposées à titre indicatif. Chaque opérateur devra les optimiser pour atteindre la résolution désirée. La hauteur du pic correspondant au 2-glycéryl monopalmitate doit avoir une hauteur minimale égale à 10 % de l'échelle de l'enregistreur),

▼ M21

— quantité de substance injectée: 0,5-1 µl de la solution (5 ml) de n-hexane (5.3.3).

5.4.1. *Identification des pics*

Les monoglycérides individuels sont identifiés en fonction des temps de rétention obtenus et par rapport à ceux obtenus avec les mélanges standards de monoglycérides analysés dans les mêmes conditions.

5.4.2. *Évaluation quantitative*

L'aire de chaque pic est calculée au moyen d'un intégrateur électronique.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Le pourcentage de glycéryl monopalmitate est calculé à partir du rapport entre l'aire du pic correspondant et la somme des aires des pics de tous les monoglycérides (voir figure 2), selon la formule:

$$\text{Glycéryl monopalmitate (\%)}: \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

Où:

A_x = aire du pic correspondant au glycéryl monopalmitate;

ΣA = somme des aires de la totalité des pics des monoglycérides.

Le résultat doit être donné avec une décimale.

7. COMPTE RENDU DE L'ANALYSE

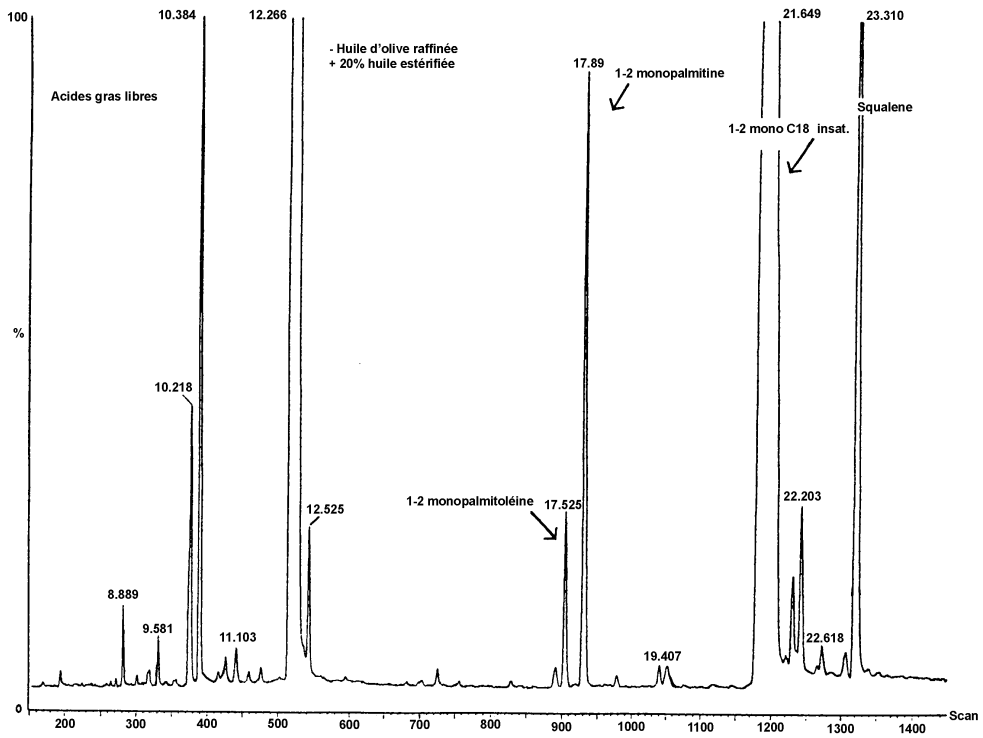
Le compte rendu de l'analyse devra spécifier:

- la référence à cette méthode,
- toute information nécessaire à l'identification complète de l'échantillon,
- le résultat de l'analyse,
- tout écart de cette méthode, qu'il s'agisse d'une décision des parties concernées ou pour une autre raison,
- les détails d'identification du laboratoire, la date de l'analyse et la signature des responsables de celle-ci.

▼ M21

Figure 1

Chromatogramme des produits de la réaction de silanisation obtenus par l'action de la lipase sur une huile d'olive raffinée additionnée de 20 % d'huile estérifiée (100 %)



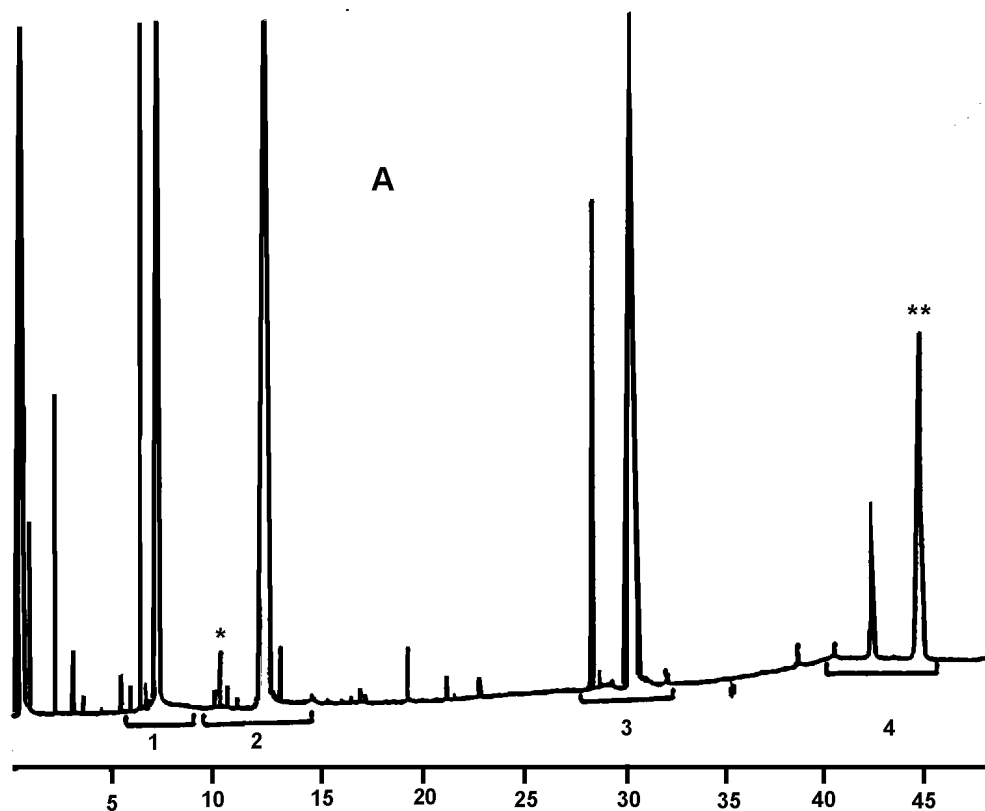
▼ M21

Figure 2

Chromatogramme de:

A) huile d'olive non estérifiée, après lipase; après silanisation; dans ces conditions (colonne capillaire 8-12 m), la fraction de cire est éluée en même temps que la fraction de diglycéride ou peu de temps après.

Après lipase, la teneur en triglycérides ne devrait pas excéder 15 %.



Légende:

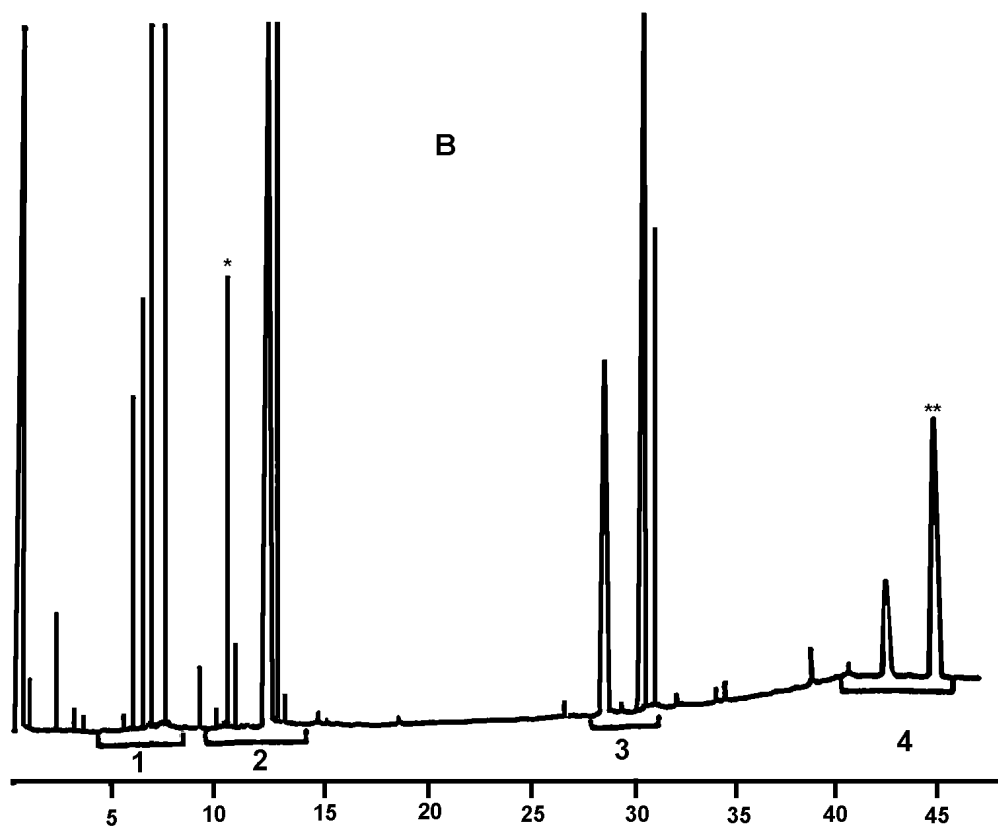
- 1 = Acides gras libres
- 2 = Monoglycérides
- 3 = Diglycérides
- 4 = Triglycérides
- * = 2-monopalmitine
- ** = Triglycéride C₅₄

▼ M21

Chromatogramme de:

B) huile estérifiée après lipase; après silanisation; dans ces conditions (colonne capillaire 8-12 m), la fraction de cire est éluée en même temps que la fraction de diglycérade ou peu de temps après.

Après lipase, la teneur en triglycérades ne devrait pas excéder 15 %.



Légende:

- 1 = Acides gras libres
- 2 = Monoglycérades
- 3 = Diglycérades
- 4 = Triglycérades
- * = 2-monopalmitine
- ** = Triglycérade C₅₄

▼ **M21**

8. NOTES

Note 1 — PRÉPARATION DE LA LIPASE

Il existe dans le commerce des lipases ayant une activité satisfaisante. Il est également possible de les préparer au laboratoire de la façon suivante:

Refroidir à 0 °C 5 kg de pancréas frais de porc. Débarrasser de la graisse solide et du tissu conjonctif qui les entourent et les triturer dans un moulin à lames jusqu'à obtention d'une pâte fluide. Agiter cette pâte pendant 4 à 6 heures avec 2,5 litres d'acétone anhydre puis centrifuger. Extraire le résidu trois autres fois avec le même volume d'acétone anhydre, puis deux fois avec un mélange acétone/éther diéthylique (1/1) (V/V) et deux fois avec de l'éther diéthylique.

Sécher le résidu pendant 48 heures sous vide pour obtenir une poudre stable qui se conservera longtemps au réfrigérateur et à l'abri de l'humidité.

Note 2 — CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ LIPASIQUE

Préparer une émulsion d'huile d'olive comme suit:

Agiter pendant 10 minutes dans un mélangeur un mélange constitué de 165 ml d'une solution de gomme arabique à 100 g/l, 15 g de glace pilée et 20 ml d'une huile d'olive préalablement neutralisée.

Introduire successivement 10 ml de cette émulsion dans un bécher de 50 ml puis 0,3 ml d'une solution de cholate de sodium à 0,2 g/ml et 20 ml d'eau distillée.

Placer le bécher dans un thermostat réglé à 37 °C; introduire les électrodes du pH-mètre et l'agitateur à hélice.

Ajouter goutte à goutte, à l'aide d'une burette, une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N jusqu'à obtention d'un pH de 8,3.

Ajouter un volume de suspension de poudre de lipase dans l'eau (0,1 g/ml de lipase). Dès que le pH-mètre indique un pH de 8,3, mettre en marche le chronomètre et ajouter la solution d'hydroxyde de sodium, goutte à goutte, au rythme nécessaire pour maintenir le pH à la valeur de 8,3. Noter chaque minute le volume de solution consommé.

Reporter les données dans un système d'axes de coordonnées en portant en abscisses les temps et en ordonnées les millilitres de solution alcaline 0,1 N consommés pour maintenir le pH constant. Un graphique linéaire doit être obtenu.

L'activité de la lipase, mesurée en unités lipase par mg, est donnée par la formule suivante:

$$A = \frac{V \times N \times 100}{m}$$

où:

A est l'activité en unités lipase/mg;

V est le nombre de millilitres de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N par minute (calculé à partir du graphique);

N est la normalité de la solution d'hydroxyde de sodium;

m est la masse en mg de la lipase d'essai.

L'unité lipase est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 10 micro-équivalents d'acide par minute.

▼ **M20**

▼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 $E_1 \text{ cm } 1 \%$ (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 idone, 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.

▼B

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. 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;

▼B

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 $0,200 \pm 0,005$.

▼B

ANNEXE X «A»

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ESTERS MÉTHYLIQUES D'ACIDES GRAS**1. 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»).

▼B

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 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 (> C₂₀) sont présents. Dans le cas de la détermination des acides en C₄ et en C₆, 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.

▼B

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 C₂₀.

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.

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.

▼B**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.

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

▼ B

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;

$w_{(I)}$ et $w_{(II)}$: 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

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

où:

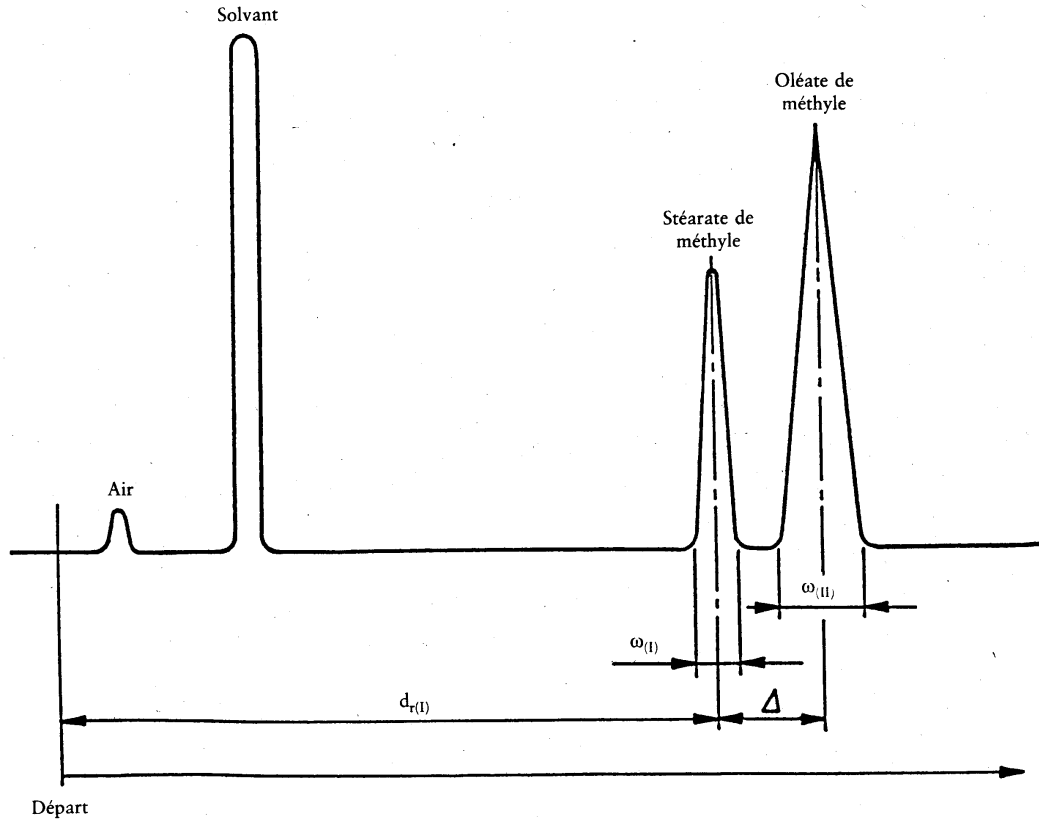
a = la hauteur du pic le plus petit, mesurée par rapport à la ligne de base,

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 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.

▼B

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:

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

où:

A_i: aire du pic correspondant au composé i;

$\sum A$: somme des aires de la totalité des pics.

▼ B

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

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:

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

où:

m_i : masse du composé *i* dans le mélange témoin.

$\sum m$: 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:

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

où:

A_i : aire du pic correspondant au composé *i*;

$\sum A$: somme des aires de la totalité des pics.

D'où, le facteur de correction:

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

Habituellement, les facteurs de correction sont exprimés par rapport à K_{C16} et les facteurs relatifs deviennent:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

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

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

Donner le résultat avec une décimale.

▼ B

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 C₄ et en C₆ sont présents à côté d'acides en C₁₆ et en C₁₈, 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 C₅, C₁₅ ou C₁₇ 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_{C16});

K'_s: facteur de correction de l'étalon interne (relatif à K_{C16});

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).

▼ M21

- 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 5.1.1 de l'annexe VII.

▼ M2

- 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*,

▼ M2

- température du détecteur: 260 °C,
- débit du gaz vecteur (hélium et hydrogène): 1,2 millilitre par minute.

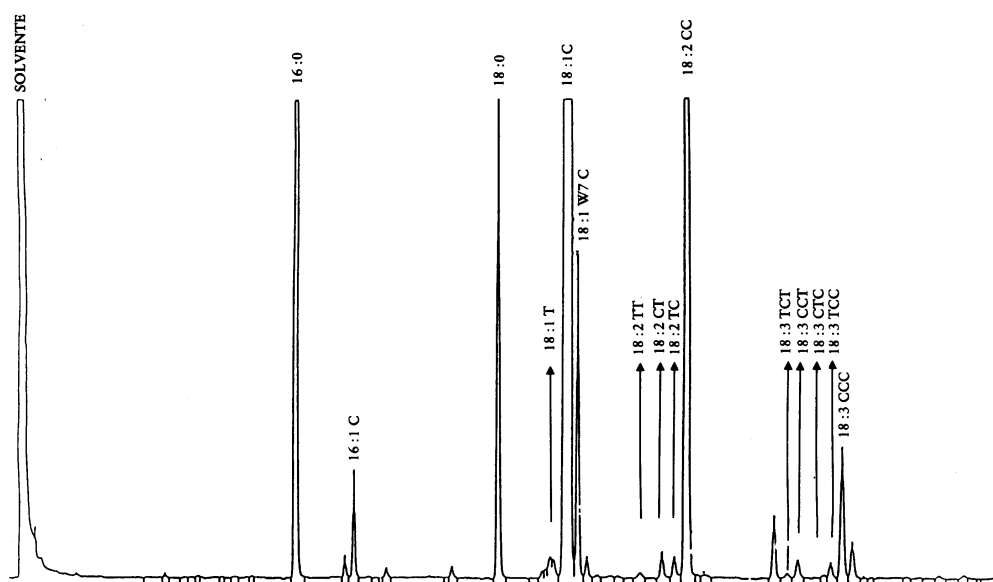
La quantité injectée doit être telle que dans les conditions de sensibilité employées la hauteur du pic correspondant à l'ester méthylique de l'acide arachidique soit égale ou supérieure à 20 % du bas de l'échelle.

- 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.

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.

▼ **M2**

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

▼ **B**

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.

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

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.

▼ **M19**

ANNEXE X «B»

PRÉPARATION DES ESTERS MÉTHYLIQUES D'ACIDES GRAS DE L'HUILE D'OLIVE ET DE L'HUILE DE GRIGNONS D'OLIVE

Les deux méthodes suivantes sont recommandées pour la préparation des esters méthyliques d'acides gras des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive.

Méthode A: Transestérification à froid au moyen d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium.

Méthode B: Méthylation à chaud au moyen d'une solution méthanolique de méthylate de sodium suivie d'une estérification en milieu acide.

Le choix entre l'une ou l'autre méthode dépendra du paramètre analytique à déterminer et de la catégorie de l'huile, comme indiqué ci-après:

a) détermination de la différence entre la teneur réelle et la teneur théorique des triglycérides à ECN42 (Δ ECN42):

— la méthode A sera appliquée aux échantillons des huiles de toutes les catégories après purification de l'huile par passage sur une colonne de gel de silice.

b) détermination de la composition en acides gras:

— la méthode A sera appliquée directement aux échantillons d'huiles des catégories suivantes:

— huiles d'olive vierges avec une acidité libre inférieure à 3,3 %,

— huile d'olive raffinée,

— huile d'olive (coupage d'huiles d'olive vierges et d'huile d'olive raffinée),

— huile de grignons d'olive raffinée,

— huile de grignons d'olive (coupage d'huiles d'olive vierges et d'huile de grignons d'olive raffinée),

— la méthode B sera appliquée directement aux échantillons d'huiles des catégories suivantes:

— huile d'olive vierge avec une acidité libre supérieure à 3,3 %,

— huile de grignons d'olive brute;

c) détermination des acides gras des isomères *trans*

— la méthode A sera appliquée directement aux échantillons d'huiles des catégories suivantes:

— huiles d'olive vierges avec une acidité libre inférieure à 3,3 %,

— huile d'olive raffinée,

— huile d'olive (coupage d'huiles d'olive vierges et d'huile d'olive raffinée),

— huile de grignons d'olive raffinée,

— huile de grignons d'olive (coupage d'huiles d'olive vierges et d'huile de grignons d'olive raffinée),

— la méthode A sera appliquée aux échantillons d'huiles des catégories suivantes après purification de l'huile par passage sur une colonne de gel de silice:

— Huile d'olive vierge avec une acidité libre supérieure à 3,3 %.

— Huile de grignons d'olive brute.

▼ M19**PURIFICATION DES ÉCHANTILLONS D'HUILE**

Si nécessaire, les échantillons seront purifiés par passage de l'huile sur une colonne de gel de silice, en utilisant comme solvant d'élution de l'hexane/oxyde diéthylique (87:13, v/v) comme décrit dans la méthode IUPAC 2.507.

Comme procédure alternative, il est possible d'avoir recours à l'extraction en phase solide en utilisant des cartouches de gel de silice. Placer une cartouche de gel de silice (1 g, 6 ml) dans un appareil d'élution à vide et laver avec 6 ml d'hexane. Cesser d'appliquer le vide pour éviter que la colonne ne sèche. Introduire ensuite dans la colonne une solution d'huile (environ 0,12 g) dans 0,5 ml d'hexane et appliquer le vide pour que la solution s'introduise dans la silice, puis éluer avec 10 ml d'hexane/oxyde diéthylique (87:13 v/v) sous vide. Homogénéiser la totalité des éluats et diviser en deux volumes similaires. Faire évaporer un des volumes jusqu'à dessiccation dans un évaporateur rotatif sous pression réduite et à température ambiante. Dissoudre le résidu dans 1 ml d'heptane. La solution obtenue est prête pour l'analyse des acides gras par CPG. Faire évaporer le second volume et dissoudre le résidu dans 1 ml d'acétone pour l'analyse des triglycérides par HPCL si nécessaire.

MÉTHODES POUR LA PRÉPARATION DES ESTERS MÉTHYLIQUES D'ACIDES GRAS**1. Méthode A: Transestérification à froid au moyen d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium****1.1. Application**

Cette méthode rapide est applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive ayant une teneur en acides gras libres inférieure à 3,3 %. Les acides gras libres ne sont pas estérifiés par l'hydroxyde de potassium. Les esters éthyliques d'acides gras se transestérifient plus lentement que les esters glycéridiques et il est possible qu'ils ne se méthylient que partiellement.

1.2. Principe

Les esters méthyliques se forment par transestérification dans une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium comme phase intermédiaire avant la saponification (point 5 de la méthode ISO 5509:2000, point 5 de la méthode IUPAC 2.301).

1.3. Réactifs

Méthanol ne contenant pas plus de 0,5 % (m/m) d'eau

Heptane pour chromatographie

Hydroxyde de potassium, solution méthanolique d'environ 2 N: dissoudre 11,2 g d'hydroxyde de potassium dans 100 ml de méthanol.

1.4. Matériel

Éprouvettes à bouchon vissant (de 5 ml de capacité) avec un bouchon muni d'un joint de PTFE.

Pipettes graduées ou automatiques de 2 ml et 0,2 ml.

1.5. Mode opératoire

Dans une éprouvette à bouchon vissant de 5 ml, peser environ 0,1 g de l'échantillon d'huile. Ajouter 2 ml d'heptane et agiter. Ajouter 0,2 ml de la solution méthanolique 2 N d'hydroxyde de potassium, boucher à l'aide du bouchon muni d'un joint en PTFE, bien fermer et agiter énergiquement pendant 30 secondes. Laisser reposer jusqu'à ce que la partie supérieure de la solution devienne claire. Décanter la couche supérieure, qui est celle qui contient les esters méthyliques. La solution d'heptane est prête pour l'injection dans le chromatographe. Il est conseillé de maintenir la solution au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse chromatographique. Il n'est pas recommandé de stocker la solution pendant plus de 12 heures.

▼ M19**2. Méthode B: Méthylation à chaud au moyen d'une solution méthanolique de méthylate de sodium suivie d'une estérification en milieu acide****2.1. Application**

Cette méthode est applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive ayant une teneur en acides gras libres supérieure à 3,3 %.

2.2. Principe

Neutralisation des acides gras libres et méthanolyse alcaline des glycérides, suivie d'une estérification des acides gras en milieu acide (point 4.2 de la méthode IUPAC n° 2.301).

2.3. Réactifs

- Heptane pour chromatographie.
- Méthanol ne contenant pas plus de 0,05 % d'eau (m/m).
- Méthylate de sodium, solution méthanolique 0,2 N: dissoudre 5 g de sodium dans 1 000 ml de méthanol (peut être préparé à partir de solutions commerciales).
- Phénolphaléine, 0,2 % solution méthanolique.
- Acide sulfurique, dans la solution méthanolique 1 N: ajouter 3 ml d'acide sulfurique à 96 % à 100 ml de méthanol.
- Solution saturée de chlorure de sodium dans l'eau.

2.4. Matériel

- Ballon volumétrique de 50 ml de capacité, à fond plat et à col rodé long et étroit
- Réfrigérant à reflux. Réfrigérant à air (de 1 m de long) muni d'un joint rodé
- Régularisateur d'ébullition
- Entonnoir en verre.

2.5. Mode opératoire

Verser 0,25 g de l'échantillon d'huile dans un ballon volumétrique muni d'un col rodé de 50 ml. À l'aide de l'entonnoir, ajouter 10 ml de la solution méthanolique 0,2 N de méthylate de sodium et le régularisateur d'ébullition. Adapter le réfrigérant à reflux, agiter et porter à ébullition. La solution doit devenir limpide au bout d'environ 10 minutes. La réaction est pratiquement terminée après 15 minutes. Retirer le ballon de la source de chaleur, attendre l'arrêt du reflux, retirer le réfrigérant et ajouter deux gouttes de la solution de phénolphaléine. Ajouter quelques ml d'acide sulfurique 1 N dans la solution méthanolique jusqu'à ce qu'elle devienne incolore, puis ajouter encore 1 ml en excès. Brancher le réfrigérant et porter de nouveau à ébullition pendant environ 20 minutes. Retirer le ballon de la source de chaleur et le refroidir sous un courant d'eau. Retirer le réfrigérant, ajouter 20 ml de la solution saturée de chlorure de sodium et agiter. Ajouter 5 ml d'heptane, boucher le ballon et agiter énergiquement pendant 15 secondes.

Laisser décanter jusqu'à séparation complète des deux phases. Ajouter de nouveau une partie de la solution saturée de chlorure de sodium jusqu'à ce que la phase aqueuse atteigne la partie inférieure du col du ballon. La couche supérieure qui se trouve dans le col du ballon est celle qui contient les esters méthyliques. La solution obtenue est prête pour l'injection dans le chromatographe en phase gazeuse.

Précaution: La méthylation avec la méthode B doit être réalisée sous hotte ventilée.

▼ M19**2.6. Alternatives à la méthylation selon la méthode B****2.6.1. Méthode C****2.6.1.1. Principe**

La matière grasse soumise à l'analyse est traitée avec une solution méthanolique d'acide chlorhydrique dans une ampoule fermée, à 100 °C

2.6.1.2. Matériel

— Ampoule de verre épais d'une capacité d'environ 5 ml (hauteur 40 à 45 mm, diamètre 14 à 16 mm).

— Pipettes graduées de 1 et 2 ml.

2.6.1.3. Réactifs

Solution d'acide chlorhydrique dans 2 % de méthanol, préparée à partir d'acide chlorhydrique gazeux et de méthanol anhydre (note 1).

Hexane pour chromatographie

Note 1: Il est possible d'employer des solutions commerciales de chlorure d'hydrogène dans le méthanol. En laboratoire, il est facile de préparer de petites quantités d'acide chlorhydrique gazeux en modifiant la solution commerciale ($p = 1,18$), par l'ajout de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Le méthanol étant très avide de gaz chlorhydrique, il est bon de prendre toutes les précautions d'usage pour la dissolution (par exemple introduire le gaz à l'aide d'un petit entonnoir renversé qui arrive juste à affleurement du niveau du méthanol). Il est possible de préparer à l'avance des quantités importantes de solutions méthanoliques d'acide chlorhydrique qui se conservent parfaitement à l'obscurité dans des flacons munis de bouchons de verre. Ce réactif peut également être préparé en dissolvant du chlorure d'acétyle dans le méthanol anhydre.

2.6.1.4. Mode opératoire

— Verser dans l'ampoule de verre 0,2 g de la matière grasse préalablement séchée au sulfate de sodium et filtrée, puis 2 ml de la solution méthanolique d'acide chlorhydrique. Fermer l'ampoule.

— Submerger l'ampoule à 100 °C pendant 40 minutes.

— Faire refroidir l'ampoule sous un courant d'eau, l'ouvrir et ajouter 2 ml d'eau distillée et 1 ml d'hexane.

— Centrifuger et extraire la phase d'hexane, prête à l'emploi.

2.6.2. Méthode D**2.6.2.1. Principe**

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

2.6.2.2. Matériel

— Tube à essai d'environ 20 ml de capacité avec réfrigérant à reflux d'air d'environ 1 m de long, muni d'un joint rodé.

▼M19

- Pipette graduée de 5 ml.
- Entonnoir à décantation de 50 ml.
- Éprouvettes de 10 ml et 25 ml.
- Tube à essai à fond conique de 15 ml.

2.6.2.3. Réactifs

- Réactif de méthylation: méthanol anhydre, hexane et acide sulfurique concentré ($p = 1,84$ dans la proportion suivante: 75:25:1 (V/V/V)).
- Éther de pétrole 40-60 °C.
- Sulfate de sodium anhydre.

2.6.2.4. Mode opératoire

Introduire dans le tube de 20 ml, 0,1 g d'huile et ajouter 5 ml du réactif de méthylation.

Adapter le réfrigérant à reflux et chauffer au bain-marie à ébullition pendant 30 minutes (note 2).

Transférer quantitativement le mélange dans un entonnoir à décantation de 50 ml avec 10 ml d'eau distillée et 10 ml d'éther de pétrole. Agiter vigoureusement et attendre que se produise la séparation des phases. Séparer la phase aqueuse et laver deux fois la couche étherée avec 20 ml d'eau distillée. Ajouter dans l'entonnoir à décantation une petite quantité de sulfate de sodium anhydre, agiter, laisser reposer quelques minutes et filtrer, en recueillant le filtrat dans un tube à fond conique de 15 ml.

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

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

3. **Paramètres de précision**

L'évaluation statistique de la précision des méthodes A et B a été publiée par le Conseil Oléicole International dans sa méthode COI/T.20/DOC. n° 24.

RECOMMANDATIONS POUR L'ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ESTERS D'ACIDES GRAS DE L'HUILE D'OLIVE ET DE L'HUILE DE GRIGNONS D'OLIVE

1. **Mode opératoire**

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de solutions d'esters gras dans l'hexane sera réalisée conformément à la norme ISO 5508, au moyen d'une colonne capillaire (50 m de long \times 0,25 ou 0,32 mm de diamètre interne) recouverte de cyanopropylsilicone, tel qu'indiqué pour la détermination des acides gras isomères *trans* (COI/T.20/Doc. n° 17).

La Figure 1 présente le profil chromatographique typique d'une huile de grignons d'olive contenant des esters méthyliques et éthyliques d'acides gras et des isomères *trans* d'esters méthyliques.

2. **Calculs**

- 2.1. Pour calculer la composition en acides gras et le Δ ECN42, les acides gras suivants doivent être pris en compte:

Myristique (C14:0)

Palmitique (C16:0). Somme des aires des pics correspondant aux esters méthyliques et éthyliques.

▼ M19

Palmitoléique (C16:1). Somme des aires des pics correspondant aux isomères ω 9 et ω 7 de l'ester méthylique.

Heptadécanoïque (C17:0).

Heptadécénoïque (C17:1).

Stéarique (C18:0).

Oléique (C18:1). Somme des aires des pics correspondant aux isomères ω 9 et ω 7 de l'ester méthylique, de l'ester éthylique et des isomères *trans* de l'ester méthylique.

Linoléique (C18:2). Somme des aires des pics correspondant aux esters méthyliques et éthyliques et aux isomères *trans* de l'ester méthylique.

Arachidique (C20:0).

Linoléinique (C18:3). Somme des aires de l'ester méthylique et des isomères *trans* de l'ester méthylique.

Eicosénoïque (C20:1)

Béhénique (C22:0)

Lignocérique (C24:0)

Le squalène n'est pas pris en compte pour le calcul de l'aire totale.

- 2.2. Pour calculer le pourcentage de *trans*-C18:1, on utilisera le pic correspondant aux esters méthyliques de cet acide gras. Pour la somme [*trans*-C18:2 + *trans*-C18:3], on additionnera tous les pics correspondant aux isomères *trans* de ces deux acides gras. Pour calculer l'aire totale, on tiendra compte de tous les pics mentionnés en 2.1 (voir COI/T.20/Doc. n° 17).

Le calcul du pourcentage de chaque acide gras sera effectué conformément à la formule suivante:

$$\% X = (\text{Aire } X \times 100) / (\text{aire totale})$$

▼ M19

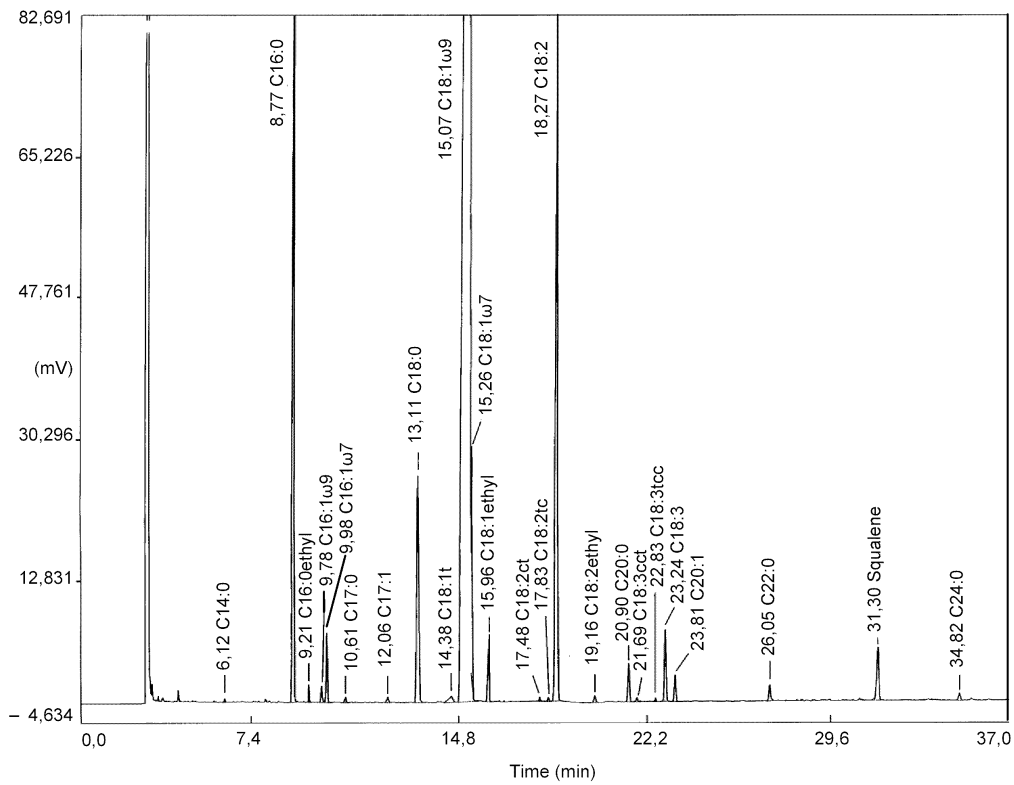


Figure 1: Profil chromatographique d'une huile de grignons d'olive, obtenu avec la méthode de méthylation à froid. Les pics chromatographiques correspondent aux esters méthyliques, sauf indication contraire.



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 le 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.

▼ **M22**

ANNEXE XII

MÉTHODE DU CONSEIL OLÉICOLE INTERNATIONAL POUR L'ÉVALUATION ORGANOLEPTIQUE DES HUILES D'OLIVE VIERGES**1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION**

La présente méthode est fondée sur la décision N° DEC-21/95-V/2007 du 16 novembre 2007 relative à la méthode révisée pour l'évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge du Conseil oléicole international. Elle a pour but d'établir la procédure pour évaluer les caractéristiques organoleptiques des huiles d'olive vierges au sens du point 1 de l'annexe XVI du règlement (CE) n° 1234/2007 et d'établir la méthode pour leur classement sur la base de ces caractéristiques. La méthode contient également des indications pour un étiquetage optionnel.

La méthode décrite n'est applicable qu'aux huiles d'olive vierges et à leur classement ou à leur étiquetage en fonction de l'intensité des défauts perçus, du fruité et des autres attributs positifs, déterminée par un groupe de dégustateurs sélectionnés, entraînés et testés, constitués en jury.

2. GÉNÉRALITÉS

Pour le vocabulaire général de base, la salle de dégustation, le verre de dégustation des huiles et toute autre question liée à la présente méthode, il est recommandé de se conformer aux prescriptions prévues par le Conseil oléicole international, en particulier la décision N° DEC-21/95-V/2007 du 16 novembre 2007 relative à la méthode révisée pour l'évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge.

3. VOCABULAIRE SPÉCIFIQUE**3.1. Attributs positifs**

Fruité: ensemble des sensations olfactives caractéristiques de l'huile, dépendant de la variété des olives, provenant de fruits sains et frais, verts ou mûrs, perçus par voie directe et/ou rétronasale.

L'attribut *fruité* est qualifié de *vert* lorsque les sensations olfactives rappellent celles des fruits verts, caractéristiques de l'huile provenant de fruits verts.

L'attribut *fruité* est qualifié de *mûr* lorsque les sensations olfactives rappellent celles des fruits mûrs, caractéristiques de l'huile provenant de fruits verts et mûrs.

Amer: goût élémentaire caractéristique de l'huile obtenue d'olives vertes ou au stade de véraison, perçu par les papilles caliciformes formant le V lingual.

Piquant: sensation tactile de picotement, caractéristique des huiles produites au début de la campagne, principalement à partir d'olives encore vertes pouvant être perçu dans toute la cavité buccale, en particulier dans la gorge.

3.2. Attributs négatifs

Chômé/Lies: flaveur caractéristique de l'huile tirée d'olives entassées ou stockées dans des conditions telles qu'elles se trouvent dans un état avancé de fermentation anaérobie ou de l'huile restée en contact avec les «boues» de décantation, ayant elles aussi subi un processus de fermentation anaérobie, dans les piles et les cuves.

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

▼ M22

Vineux-vinaigré/Acide-aigre: flaveur caractéristique de certaines huiles rappelant le vin ou le vinaigre. Elle est due fondamentalement à un processus de fermentation aérobie des olives ou des restes de pâte d'olive dans des scourtins qui n'auraient pas été correctement lavés, qui donne lieu à la formation d'acide acétique, d'acétate d'éthyle et d'éthanol.

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

Rance: flaveur des huiles ayant subi un processus d'oxydation intense.

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 thermiques inappropriées.

Foin-bois: flaveur caractéristique de certaines huiles provenant d'olives sèches.

Grossier: sensation bucco-tactile dense et pâteuse produite par certaines vieilles huiles.

Lubrifiants: flaveur de l'huile qui rappelle celle du gazole, de la graisse ou de l'huile minérale.

Margines: flaveur acquise par l'huile à la suite d'un contact prolongé avec les eaux de végétation qui ont subi des processus de fermentation.

Saumure: flaveur de l'huile obtenue d'olives conservées en saumure.

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

Terre: flaveur de l'huile obtenue d'olives ramassées avec de la terre ou boueuses et non lavées.

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

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

Bois humide: flaveur caractéristique d'huiles extraites d'olives ayant fait l'objet d'un processus de congélation sur l'arbre.

3.3. Terminologie optionnelle aux fins de l'étiquetage

Sur demande, le chef du jury peut certifier que les huiles évaluées remplissent les définitions et intervalles correspondant aux expressions et aux adjectifs suivants en fonction de l'intensité et de la perception des attributs:

- a) pour chacun des attributs positifs mentionnés au point 3.1 (*fruité*, le cas échéant qualifié de *vert* ou de *mûr*, *piquant* et *amer*):
 - i) le terme «intense» peut être employé lorsque la médiane de l'attribut concerné est supérieure à 6;
 - ii) le terme «moyen» peut être employé lorsque la médiane de l'attribut concerné est comprise entre 3 et 6;
 - iii) le terme «léger» peut être employé lorsque la médiane de l'attribut concerné est inférieure à 3;

▼ **M22**

iv) les attributs concernés peuvent être employés sans référence aux adjectifs mentionnés aux points i), ii) et iii) lorsque la médiane de l'attribut concerné est supérieure ou égale à 3;

b) le terme «équilibré» peut être employé pour une huile qui n'est pas déséquilibrée. On entend par déséquilibre la sensation olfacto-gustative et tactile de l'huile dans laquelle la médiane de l'attribut *amer* et/ou celle de l'attribut *piquant* est supérieure de deux points à la médiane de l'attribut *fruité*;

c) l'expression «huile douce» peut être employée pour une huile dans laquelle la médiane de l'attribut *amer* et celle de l'attribut *piquant* sont inférieures ou égales à 2.

4. JURY

Le jury est composé d'un chef de jury et de huit à douze dégustateurs.

Le chef du jury doit avoir reçu une formation solide et être un connaisseur et un expert averti des différents types d'huiles. Il est responsable du jury, de son organisation et de son fonctionnement, de la préparation, de la codification et de la présentation des échantillons aux dégustateurs ainsi que du recueil des données et de leur traitement statistique.

Le chef du jury sélectionne les dégustateurs et veille à leur entraînement et au contrôle de leurs performances, afin d'assurer qu'ils se maintiennent à un niveau d'aptitude adéquat.

Les dégustateurs pour les contrôles organoleptiques d'huile d'olive doivent être choisis et entraînés en fonction de leur habilité à distinguer entre des échantillons similaires, conformément au guide du Conseil oléicole international pour la sélection, l'entraînement et le contrôle des dégustateurs qualifiés d'huiles d'olive vierges.

Les jurys doivent s'engager à participer à des évaluations organoleptiques prévues sur les plans national, communautaire ou international pour le contrôle périodique et l'harmonisation des critères de perception. Par ailleurs, dans le cas des jurys agréés conformément aux dispositions de l'article 4, paragraphe 1, du présent règlement, ils doivent fournir annuellement à l'État membre concerné tous renseignements sur leur composition et le nombre d'évaluations réalisées en tant que jury agréé.

5. PROCÉDURE POUR L'ÉVALUATION ORGANOLEPTIQUE ET LE CLASSEMENT

5.1. Utilisation de la feuille de profil par le dégustateur

La feuille de profil à utiliser par le dégustateur figure à l'appendice A de la présente méthode.

Chaque dégustateur faisant partie du jury doit flairer, puis déguster l'huile soumise à examen. Il doit ensuite porter sur les échelles de 10 cm de la feuille de profil à sa disposition l'intensité à laquelle il perçoit chacun des attributs négatifs et positifs⁽¹⁾. En cas de perception du caractère vert ou mûr de l'attribut fruité, le dégustateur coche la case correspondante de la feuille de profil.

Au cas où des attributs négatifs non indiqués sur la feuille de profil seraient perçus, ils doivent être portés sous la rubrique «autres», en employant le ou les termes les décrivant avec le plus de précision parmi ceux définis.

⁽¹⁾ Le dégustateur pourra s'abstenir de déguster une huile quand il appréciera par voie olfactive directe quelque attribut négatif extrêmement intense. Il notera sur la feuille de profil cette circonstance exceptionnelle.

▼ **M22****5.2. Utilisation des données par le chef de jury**

Le chef du jury doit recueillir les feuilles de profil remplies par chacun des dégustateurs; il doit contrôler les intensités assignées aux différents attributs; dans l'hypothèse d'une anomalie constatée, il demandera au dégustateur de réviser sa feuille de profil et, si nécessaire, de répéter l'essai.

Le chef du jury peut saisir les données de chaque dégustateur sur un logiciel informatique conforme à la méthode du calcul statistique de la médiane figurant à l'appendice B. L'insertion des données pour un échantillon est à réaliser à l'aide d'une matrice composée de neuf colonnes correspondant aux neuf attributs sensoriels et de n lignes correspondant aux n dégustateurs du jury.

Lorsqu'un attribut négatif perçu par au moins 50 % du jury est porté sous la rubrique «autres», la médiane de ce défaut sera calculée et l'huile classée en conséquence.

Le chef de jury ne peut certifier que l'huile évaluée remplit les conditions mentionnées au point 3.3.a en ce qui concerne les termes «vert» et «mûr» que lorsqu'au moins 50 % du jury a signalé avoir perçu le caractère vert ou mûr de l'attribut fruité.

Dans le cas des analyses effectuées dans le cadre de contrôles de conformité, un essai est réalisé. Dans le cas d'analyses contradictoires, le chef de jury doit faire procéder à la réalisation de l'analyse en double. Dans le cas d'analyses dirimantes, l'évaluation doit être réalisée en triplicata. Dans ces cas, la médiane des attributs sera calculée à partir de la moyenne des médianes. Tous les réplicats de ces analyses devront être réalisés au cours de séances distinctes.

5.3. Classement des huiles

L'huile est classée dans les catégories ci-dessous, en fonction de la médiane des défauts et de la médiane de l'attribut fruité. La médiane des défauts est définie comme la médiane du défaut perçu avec la plus grande intensité. La médiane des défauts et la médiane du fruité sont exprimées avec une seule décimale, et la valeur du coefficient de variation robuste qui les définit devra être inférieure ou égale à 20 %.

Le classement de l'huile est effectué par comparaison de la valeur de la médiane des défauts et de la médiane du fruité avec les intervalles de référence exposés ci-après. Les limites de ces intervalles ayant été établies en tenant compte de l'erreur de la méthode, elles sont considérées comme absolues. Les logiciels informatiques permettent un classement visualisé sur un tableau des données statistiques ou graphiquement.

- a) *Huile d'olive vierge extra*: la médiane des défauts est égale à 0 et la médiane du fruité est supérieure à 0;
- b) *huile d'olive vierge*: la médiane des défauts est supérieure à 0 et inférieure ou égale à 3,5, et la médiane du fruité est supérieure à 0;
- c) *huile d'olive lampante*: la médiane des défauts est supérieure à 3,5; ou la médiane des défauts est inférieure ou égale à 3,5 et la médiane du fruité est égale à 0.

5.4. Cas particulier

Lorsque la médiane d'un attribut positif autre que le fruité est supérieure à 5,0, le chef de jury le signalera sur le certificat d'analyse de l'huile.

▼ **M22***Appendice A***Feuille de profil de l'huile d'olive vierge**

INTENSITÉ DE PERCEPTION DES DÉFAUTS

Chômé/lies	_____ →
Moisi – humidité-terre	_____ →
Vineux – vinaigré – Acide – aigre	_____ →
Métallique	_____ →
Rance	_____ →
Autres (à préciser)	_____ →

INTENSITÉ DE PERCEPTION DES ATTRIBUTS POSITIFS

Fruité	_____ →
	Vert <input type="checkbox"/> Mûr <input type="checkbox"/>
Amer	_____ →
Piquant	_____ →

Nom du dégustateur:**Code de l'échantillon:****Date:****Observations:**

▼ **M22***Appendice B***MÉTHODE DE CALCUL DE LA MÉDIANE ET DES INTERVALLES DE CONFIANCE****Médiane**

$$Me = [P(X < X_m) \leq 1/2 \wedge P(X \leq X_m) \geq 1/2]$$

La médiane est définie comme le nombre réel X_m caractérisé par le fait que la probabilité (P) que les valeurs de la distribution (X) soient inférieures à ce nombre (X_m) est inférieure ou égale à 0,5 et que, simultanément, la probabilité (P) que les valeurs de la distribution (X) soient inférieures ou égales à X_m est supérieure ou égale à 0,5. Une autre définition considère la médiane comme étant le cinquantième percentile d'une distribution de nombres ordonnés par ordre croissant. En termes plus simples, la médiane représente la valeur centrale d'une série ordonnée de nombres impairs, ou bien la moyenne des deux valeurs centrales d'une série ordonnée de nombres pairs.

Écart type robuste

Pour obtenir une estimation fiable de la variabilité qui se produit autour de la médiane, il faut se reporter à l'estimation de l'écart type robuste d'après Stuart et Kendall. La formule suivante indique l'écart type asymptotique, c'est-à-dire l'estimation robuste de la variabilité des données considérées, où N est le nombre d'observations et IQR l'intervalle interquartile, qui renferme exactement 50 % des cas d'une distribution de probabilité quelconque.

$$S^* = \frac{1,25 \text{ IQR}}{1,35 \sqrt{N}}$$

Le calcul de l'intervalle interquartile s'effectue en calculant la magnitude de l'écart entre le soixante-quinzième et le vingt-cinquième percentile.

$$\text{IQR} = 75^{\text{e}} \text{ percentile} - 25^{\text{e}} \text{ percentile}$$

Le percentile est la valeur X_{pc} caractérisée par le fait que la probabilité (P) que les valeurs de la distribution soient inférieures à X_{pc} est inférieure ou égale à un centième déterminé et que, simultanément, la probabilité (P) que les valeurs de la distribution soient inférieures ou égales à X_{pc} est supérieure ou égale audit centième. Le centième indique la fraction de distribution retenue. Dans le cas de la médiane, celle-ci est égale à 50/100.

$$\text{Percentile} = \left[P(X < X_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge P(X \leq X_{pc}) \geq \frac{n}{100} \right]$$

Dans la pratique, le percentile est la valeur de distribution correspondant à une aire déterminée tracée à partir de la courbe de distribution ou de densité. À titre d'exemple, le vingt-cinquième percentile représente la valeur de distribution correspondant à une aire égale à 0,25 ou à 25/100.

Coefficient de variation % robuste

Le CVr% représente un nombre pur, c'est-à-dire sans dimension, qui indique le pourcentage de variabilité de la série de nombres analysée. C'est pour cette raison que ce coefficient est très utile pour vérifier la fiabilité des membres du jury.

$$\text{CVr \%} = \frac{S^*}{Me} 100$$

▼ M22**Intervalles de confiance à 95 % sur la médiane**

Les intervalles de confiance à 95 % (valeur de l'erreur de première espèce égale à 0,05 ou à 5 %) représentent l'intervalle où la valeur de la médiane pourrait varier dans l'hypothèse où il serait possible de répéter l'expérience un nombre de fois infini. Dans la pratique, cet intervalle indique l'intervalle de variabilité de l'essai dans les conditions opératoires retenues, si l'on part de l'hypothèse que l'essai pourrait être répété plusieurs fois. L'intervalle aide à évaluer, comme dans le cas du CVr%, la fiabilité de l'essai.

$$IC_{\text{sup}} = Me + (c.S^*)$$

$$IC_{\text{inf}} = Me - (c.S^*)$$

Où c, dans le cas de l'intervalle de confiance à 0,95, est égal à 1,96.

▼ M20

▼ M19

▼B*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 thermorégulation 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 %.

▼B**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 $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ 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).

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 $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ 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:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

▼B

où: S est le pourcentage en masse d'extrait du produit tel quel,
m₀ est la masse, en grammes, de la prise d'essai,
m₁ 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.

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 ICI_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;

▼B

V_2 : 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.

▼ **M11**

ANNEXE XVII

**MÉTHODE DE DÉTERMINATION DES STIGMASTADIÈNES DANS
LES HUILES VÉGÉTALES**

1. OBJET

Détermination des stigmastadiènes dans les huiles végétales contenant de faibles concentrations de ces hydrocarbures, en particulier dans les huiles d'olive vierge et les huiles de grignons d'olive.

2. CHAMP D'APPLICATION

La méthode est utilisable pour toutes les huiles végétales, mais les mesures ne sont fiables que lorsque la teneur en hydrocarbures est comprise entre 0,01 et 4 mg/kg. Cette méthode est particulièrement adaptée pour détecter la présence d'huiles végétales raffinées (olive, grignons d'olive, tournesol, palme, etc) dans l'huile d'olive vierge, étant donné que les huiles raffinées contiennent des stigmastadiènes, alors que les huiles vierges n'en contiennent pas.

3. PRINCIPE

Isolement de l'insaponifiable. Séparation de la fraction d'hydrocarbures stéroïdes par chromatographie sur colonne sur gel de silice et analyse par chromatographie capillaire en phase gazeuse.

4. APPAREILLAGE

- 4.1. Flacons appropriés de 250 millilitres avec condenseur à reflux.
- 4.2. Ampoules à décanter de 500 millilitres.
- 4.3. Flacons à fond rond de 100 millilitres.
- 4.4. Évaporateur rotatif.
- 4.5. Colonne de chromatographie en verre (de 1,5 à 2,0 centimètres de diamètre interne sur 50 centimètres de longueur) avec bouchon en Teflon et tampon de laine de verre ou disque de verre fritté dans le fond. Pour préparer la colonne de gel de silice, verser de l'hexane dans la colonne de chromatographie sur une hauteur d'environ 5 centimètres, puis compléter avec une suspension de gel de silice dans de l'hexane (15 grammes dans 40 millilitres) en utilisant des fractions d'hexane. Laisser reposer, puis soumettre à de légères vibrations. Ajouter du sulfate de sodium anhydre sur environ 0,5 centimètre de hauteur, puis éluer l'hexane en excès.
- 4.6. Appareil de chromatographie en phase gazeuse avec détecteur d'ionisation à flamme, injecteur-diviseur ou sur colonne refroidie («on -column») et four programmable à ± 1 °C près.
- 4.7. Colonne capillaire en silice fondue pour chromatographie en phase gazeuse (0,25 ou 0,5 millimètre de diamètre interne sur 25 mètres de longueur) recouvertes d'une phase de phénylméthylsilicone à 5 % formant un film de 0,25 micron d'épaisseur.

Remarque 1.

Il est possible d'utiliser d'autres colonnes de polarité similaire ou inférieure.

- 4.8. Intégrateur-enregistreur permettant une intégration de vallée à vallée.
- 4.9. Microseringue de 5 à 10 μ l (microlitres) pour chromatographie en phase gazeuse avec aiguille cémentée.
- 4.10. Chauffe-ballon électrique ou plaque chauffante.

▼M11

5. RÉACTIFS

Sauf indication contraire, tous les réactifs doivent être purs. Il convient d'utiliser de l'eau distillée ou de l'eau d'une pureté au moins équivalente.

- 5.1. Hexane ou mélange d'alcane de point d'ébullition compris entre 65 et 70 °C, distillés à l'aide d'une colonne de fractionnement.

Remarque 2.

Le solvant doit être distillé pour éliminer les impuretés.

- 5.2. Éthanol à 96 v/v.

- 5.3. Sulfate de sodium anhydre.

- 5.4. Solution d'hydroxyde de potassium alcoolique à 10 %. Ajouter 10 millilitres d'eau à 50 grammes d'hydroxyde de potassium, mélanger, puis dissoudre le mélange dans de l'éthanol jusqu'à obtention de 500 millilitres de solution.

Remarque 3.

La potasse alcoolique brunit au repos. Elle doit être préparée fraîchement chaque jour et conservée dans des flacons en verre brun bin fermés.

- 5.5. Gel de silice 60 pour colonne de chromatographie, maille 70 à 230 (Merck réf. 7734 ou similaire).

Remarque 4.

En général, le gel de silice peut être utilisé directement tel qu'il se présente dans le conteneur, sans traitement préalable. Toutefois, certains lots de silice peuvent présenter une faible activité, ce qui se traduit par une mauvaise séparation chromatographique. Dans ce cas, il convient de traiter le gel de silice de la façon suivante: désactiver le gel de silice en le chauffant à 550 °C pendant 4 heures au minimum. Après chauffage, placer le gel de silice dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement, puis le transvaser dans un flacon fermé. Ajouter 2 % d'eau et secouer jusqu'à disparition des grumeaux et obtention d'une poudre flottant librement. Si certains lots de gel de silice donnent des chromatogrammes présentant des pics parasites, le gel de silice doit être traité comme indiqué ci-dessus. Une autre solution consiste à utiliser un autre gel de silice pur (Merck, réf. 7754).

- 5.6. Solution mère (200 ppm) de cholesta-3,5-diène (Sigma, pureté de 99 %) dans de l'hexane. (10 milligrammes dans 50 millilitres).

- 5.7. Solution standard de cholesta-3,5-diène dans de l'hexane à une concentration de 20 ppm, obtenue par dilution de la solution précédente.

Remarque 5.

Conservées à une température inférieure à 4 °C, les solutions désignées aux points 5.6 et 5.7 se conserveront pendant au moins 4 mois.

- 5.8. Solution de n-nonacosane dans de l'hexane à une concentration d'environ 100 ppm.

- 5.9. Gaz vecteur pour la chromatographie: hélium ou hydrogène d'une pureté de 99,9990 %.

- 5.10. Gaz auxiliaires pour le détecteur d'ionisation à flamme: hydrogène d'une pureté de 99,9990 % et air purifié.

▼ M11**6. MÉTHODE****6.1. Préparation de l'insaponifiable:**

- 6.1.1. Peser $20 \pm 0,1$ grammes d'huile dans un flacon de 250 millilitres (point 4.1), ajouter 1 millilitre de la solution standard de cholesta-3,5-diène (20 microgrammes) et 75 millilitres de potasse alcoolique à 10 %, mettre en place le condenseur à reflux et chauffer en maintenant en légère ébullition pendant 30 minutes. Éloigner le flacon contenant l'échantillon de la source de chaleur et laisser refroidir légèrement (ne pas laisser refroidir complètement, sinon l'échantillon figerait). Ajouter 100 millilitres d'eau et transvaser la solution dans une ampoule à décanter (point 4.2) avec 100 millilitres d'hexane. Secouer le mélange énergiquement pendant 30 secondes et laisser les différentes couches se former.

Remarque 6.

S'il se forme une émulsion qui ne disparaît pas rapidement, ajouter de petites quantités d'éthanol.

- 6.1.2. Transférer la phase aqueuse du dessous dans une seconde ampoule à décanter et extraire à nouveau avec 100 millilitres d'hexane. Récupérer à nouveau la phase inférieure et laver les extraits d'hexane (regroupés dans une autre ampoule à décanter) trois fois avec chaque fois 100 millilitres d'un mélange éthanol-eau (1: 1) jusqu'à obtention d'un pH neutre.
- 6.1.3. Faire passer la solution d'hexane sur du sulfate de sodium anhydre (50 grammes), laver avec 20 millilitres d'hexane et faire sécher dans un évaporateur rotatif à 30 °C et à une faible pression.

6.2. Séparation de la fraction d'hydrocarbures stéroïdes:

- 6.2.1. Placer le résidu dans la colonne de fractionnement avec deux fractions d'1 millilitre d'hexane, faire s'écouler l'échantillon le long de la colonne en amenant le niveau de la solution au-dessus du sulfate de sodium et commencer l'élution chromatographique avec l'hexane à un débit de 1 millilitre par minute environ. Éliminer le premier éluat de 25 à 30 millilitres, puis recueillir la fraction de 40 millilitres suivante. Ensuite, transférer cette fraction dans un flacon à fond rond de 100 millilitres (point 4.3).

Remarque 7.

La première fraction contient les hydrocarbures saturés (figure 1a) et la seconde, les hydrocarbures stéroïdes. En poursuivant l'élution, on obtient du squalène et des composés apparentés. Pour obtenir une bonne séparation entre les hydrocarbures saturés et les hydrocarbures stéroïdes, le volume des fractions doit être optimal. À cet effet, il convient d'ajuster le volume de la première fraction de manière que, lors de l'analyse de la seconde fraction, les pics représentant les hydrocarbures saturés soient faibles (figure 1c); si ces pics ne se forment pas, mais que l'intensité du pic standard est faible, il faut réduire le volume. En tout état de cause, il est inutile de séparer complètement les composants de la première et de la seconde fractions, étant donné qu'il n'y a pas de chevauchement des pics lors de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse si les conditions de la CG sont ajustées conformément au point 6.3.1. En général, il est inutile d'optimiser le volume de la seconde fraction car on obtient une bonne séparation avec les composants suivants. Quoi qu'il en soit, la formation d'un grand pic à un temps de rétention inférieur d'environ 1,5 minute à celui du pic standard est due au squalène et témoigne d'une mauvaise séparation.

- 6.2.2. Faire évaporer la seconde fraction dans un évaporateur à 30 °C et à une faible pression jusqu'à séchage, puis dissoudre immédiatement le résidu dans 0,2 millilitre d'hexane. Conserver la solution au réfrigérateur jusqu'à analyse.

Remarque 8.

Les résidus désignés aux points 6.1.3 et 6.2.2 ne doivent pas être conservés secs et à température ambiante. Dès leur obtention, il convient d'ajouter le solvant et de conserver les solutions au réfrigérateur.

▼ M11**6.3. Chromatographie en phase gazeuse**

6.3.1. Conditions opératoires applicables à l'injection:

- température de l'injecteur: 300 °C,
- température du détecteur: 320 °C,
- intégrateur-enregistreur: les paramètres d'intégration doivent être fixés de manière à permettre une évaluation correcte des aires. Le mode d'intégration de vallée à vallée est recommandé,
- sensibilité: environ 16 fois l'atténuation minimale,
- quantité de solution injectée: 1 microlitre,
- températures de programmation du four: température initiale de 235 °C pendant 6 minutes, puis élévation de 2 °C par minute jusqu'à 285 °C,
- injecteur avec diviseur de débit 1: 15,
- vecteur: hélium ou hydrogène à une pression d'environ 120 kPa.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques du chromatographe et de la colonne, de manière que les chromatogrammes répondent aux exigences suivantes: formation du pic standard interne à plus ou moins 5 minutes du temps indiqué au point 6.3.2; le pic standard interne doit s'étirer sur au moins 80 % de l'échelle totale.

Il y a lieu de vérifier le système de chromatographie en phase gazeuse en injectant un mélange de solution mère de cholestadiène (point 5.6) et de solution de n-nonacosane (point 5.8). Le pic du cholesta-3,5-diène doit se former avant celui du n-nonacosane (figure 1c); si cela ne se produit pas, deux mesures peuvent être prises: réduire la température du four et/ou utiliser une colonne moins polaire.

6.3.2. Identification des pics

Le pic standard interne se forme à environ 19 minutes et le stigmasta-3,5-diène à un temps de rétention relatif d'environ 1,29 (voir figure 1b). Le stigmastadiène s'accompagne de faibles quantités d'isomère et, généralement, ils produisent un pic chromatographique unique. Néanmoins, si la colonne est trop polaire ou si elle présente un grand pouvoir de résolution, l'isomère peut former un petit pic avant celui du stigmasta-3,5-diène et très près de lui (figure 2). Pour garantir que les stigmastadiènes produisent un pic unique, il est conseillé de remplacer la colonne par une autre moins polaire ou à diamètre interne plus large.

Remarque 9.

La méthode de détermination des hydrocarbures stéroïdes appliquée à l'analyse d'une huile végétale raffinée permet d'obtenir un pic témoin pour les stigmastadiènes. La substance fait apparaître un pic de hauteur appréciable, facilement identifiable.

6.3.3. Analyse quantitative

La teneur en stigmastadiène est déterminée par la formule suivante:

$$\text{mg/kg de stigmastadiènes} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

▼ M11

- où:
- A_s = aire du pic de stigmastadiène (si le pic est résolu en deux isomères, somme des aires des deux isomères).
 - A_c = aire du standard interne (cholestadiène).
 - M_c = masse de standard ajoutée, en microgrammes.
 - M_o = masse d'huile prélevée, en grammes.

Limite de détection: 0,01 mg/kg environ.

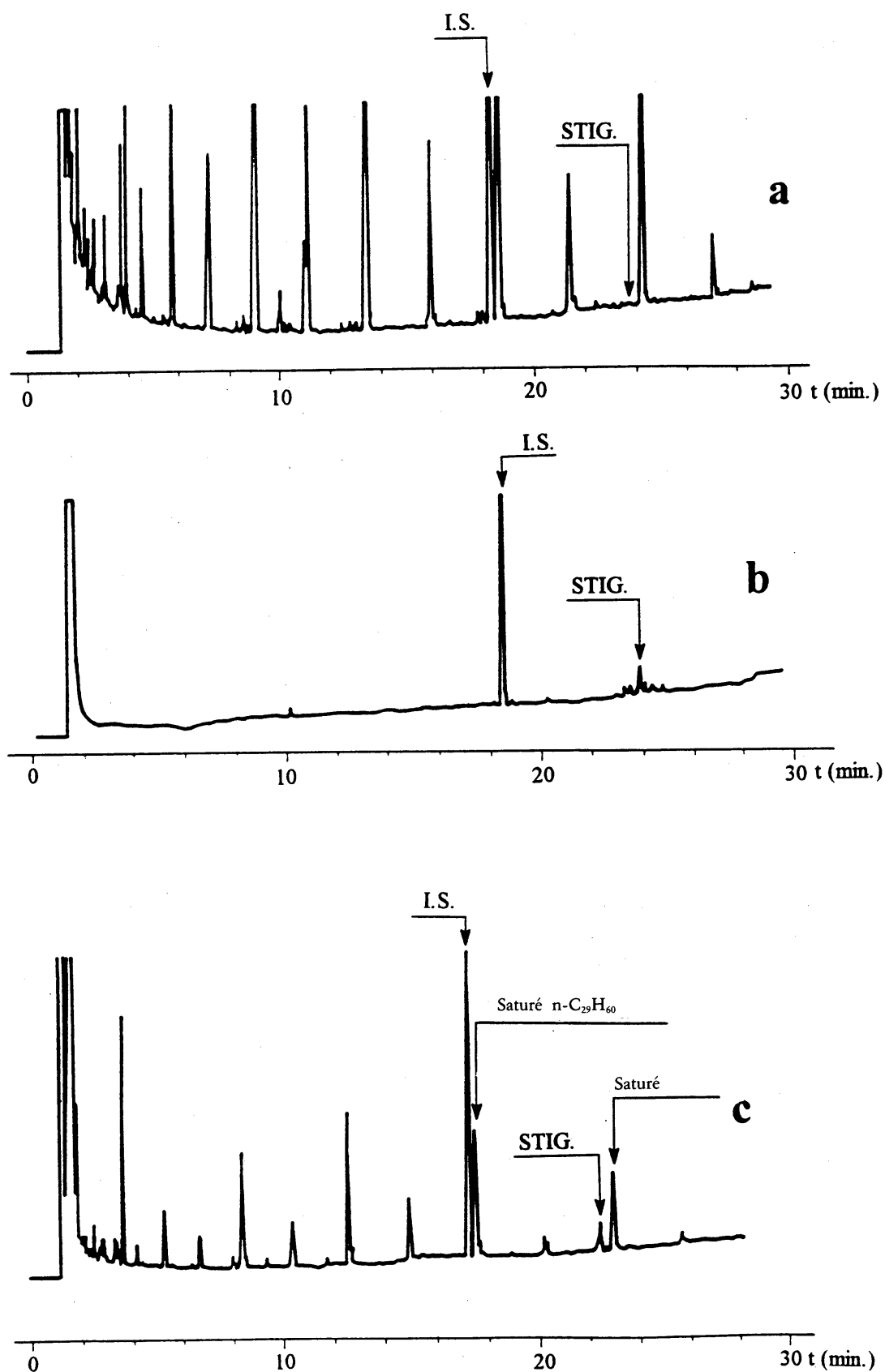
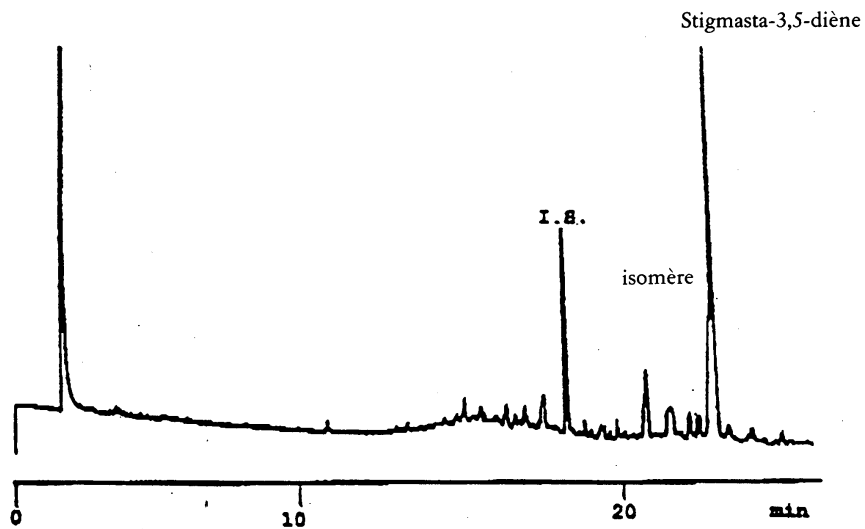
▼ M11

Figure 1

Chromatogrammes (chromatographie en phase gazeuse) obtenus par analyse d'échantillons d'huile d'olive sur une colonne capillaire en silice fondue (0,25 millimètre de diamètre interne sur 25 mètres de longueur) recouverte d'un film de 0,25 micron d'épaisseur de phénylméthylsilicone à 5 %.

▼ M11

- a) Première fraction (30 millilitres) d'une huile vierge, éluée avec le standard.
- b) Seconde fraction (40 millilitres) d'une huile d'olive contenant 0,10 mg/kg de stigmastadiènes.
- c) Seconde fraction (40 millilitres) contenant une petite proportion de la première fraction.

**Figure 2**

Chromatogramme en phase gazeuse obtenu à partir d'un échantillon d'huile d'olive raffinée analysé sur une colonne DB-5 sur laquelle figure l'isomère de stigmasta-3,5-diène.

▼ **M13***ANNEXE XVIII***DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION DES TRIGLYCÉRIDES À ECN42 (DIFFÉRENCE ENTRE COMPOSITION THÉORIQUE ET COMPOSITION RÉELLE)****1. Objet**

Détermination de la composition des triglycérides (TAG) dans les huiles d'olive, en terme d'indice d'équivalent carbone, par les différences entre les résultats d'analyse obtenus par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et la composition théorique, calculée au départ de la composition en acides gras.

2. Champ d'application

La norme s'applique aux huiles d'olive. La méthode vise à détecter la présence de faibles quantités d'huiles de graines (riches en acide linoléique) dans chaque catégorie d'huile d'olive.

3. Principe

La composition des triglycérides à ECN42 déterminée par HPLC et la composition théorique des triglycérides à ECN42 (calculée sur la base de la détermination GLC de la composition en acides gras) correspondent dans une certaine limite pour les huiles pures. Une différence supérieure aux valeurs mentionnées dans le règlement pour chaque catégorie d'huile indique que l'huile contient des huiles de graines.

4. Méthode

La méthode permettant de calculer la composition théorique des triglycérides à ECN42 et la différence entre les données HPLC et celle-ci est constituée par la coordination des données d'analyse obtenues par d'autres méthodes; on peut distinguer trois phases: détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse, calcul de la composition théorique des triglycérides à ECN42, détermination HPLC des triglycérides à ECN42.

4.1. Appareillage

- 4.1.1. Ballons à fond rond de 250 et 500 ml.
- 4.1.2. Bêchers de 100 ml.
- 4.1.3. Colonne en verre pour chromatographe (diamètre intérieur: 21 mm, longueur 450 mm) avec robinet et cône normalisé (femelle) au sommet.
- 4.1.4. Ampoules à décanter de 250 ml avec cône normalisé (mâle) à la base, pouvant s'adapter au sommet de la colonne.
- 4.1.5. Baguette en verre de 600 mm de longueur.
- 4.1.6. Entonnoir en verre de 80 mm de diamètre.
- 4.1.7. Ballons tarés de 50 ml.
- 4.1.8. Ballons tarés de 20 ml.
- 4.1.9. Évaporateur rotatif.
- 4.1.10. Chromatographe en phase liquide à haute performance, équipé d'un contrôle thermostatique de la température de la colonne.
- 4.1.11. Vannes d'injection pour 10 µl.
- 4.1.12. Détecteur: réfractomètre différentiel. La sensibilité pleine échelle doit atteindre au moins 10^{-4} unités d'indice de réfraction.

▼ M13

4.1.13. Colonne: tube en acier inoxydable de 250 mm de longueur et de 4,5 mm de diamètre intérieur, rempli de particules de silice de 5 µm de diamètre, avec 22 à 23 % de carbone sous forme d'octadécylsilane (note 2).

4.1.14. Enregistreur et/ou intégrateur.

4.2. Réactifs

Les réactifs doivent être de pureté analytique. Les solvants d'élution doivent être dégazés et peuvent être recyclés plusieurs fois sans que les séparations n'en soient affectées.

4.2.1. Éther de pétrole 40-60 °C pour chromatographie.

4.2.2. Éther éthylique, exempt de peroxydes, fraîchement distillé.

4.2.3. Solvant d'élution pour chromatographe en verre: mélange d'éther de pétrole/éther éthylique selon les proportions 87/13 (v/v).

4.2.4. Gel de silice, granulométrie 70-230, type Merck 7734, normalisé avec 5 % d'eau (m/m)

4.2.5. Laine de verre.

4.2.6. Acétone.

4.2.7. Acétonitrile.

4.2.8. Solvant d'élution HPLC: acétonitrile + acétone (dont les proportions doivent être ajustées pour obtenir la séparation souhaitée; commencer avec le mélange 50:50).

4.2.9. Solvant de solubilisation: acétone.

4.2.10. Triglycérides de référence: soit des triglycérides que l'on trouve dans le commerce (tripalmitine, trioléine, etc.) et les temps de rétention sont alors reportés conformément à l'indice d'équivalent carbone, soit des chromatogrammes de référence obtenus à partir d'huile de soja, d'un mélange d'huile de soja-huile d'olive 30:70 et d'huile d'olive pure (voir notes 3 et 4 et figures 1, 2, 3 et 4).

4.3. Préparation des échantillons

Étant donné qu'un certain nombre de substances peuvent provoquer une interférence et donner ainsi des résultats positifs erronés, l'échantillon doit toujours être purifié selon la méthode IUPAC 2.507, utilisée pour la détermination des substances polaires dans les huiles oxydées.

4.3.1. Préparation de la colonne de chromatographie

Remplir la colonne (4.1.3) avec 30 ml environ de solvant d'élution (4.2.3); introduire ensuite un tampon de laine de verre (4.2.5) dans la colonne, l'enfoncer jusqu'au fond de la colonne au moyen de la baguette en verre (4.1.5).

Préparer dans un bécher de 100 ml une suspension avec 25 g de gel de silice (4.2.4) dans 80 ml de mélange d'élution (4.2.3); la transférer ensuite dans la colonne au moyen d'un entonnoir en verre (4.1.6).

Afin d'être sûr que la totalité du gel de silice a été transférée dans la colonne, laver le bécher avec le mélange d'élution et transférer également le liquide de lavage dans la colonne.

Ouvrir le robinet et laisser le solvant s'écouler jusqu'à ce que son niveau se situe à 1 cm au-dessus du gel de silice.

▼ **M13**

4.3.2. Chromatographie sur colonne

Peser, avec un degré de précision de 0,001 g, 2,5 +/-0,1 g d'huile, préalablement filtrée, homogénéisée et, si nécessaire, déshydratée dans un ballon taré de 50 ml (4.1.7). Diluer dans 20 ml environ de solution d'élution (4.2.3); si nécessaire, chauffer légèrement pour faciliter la dissolution. Refroidir à température ambiante et porter au volume avec du solvant d'élution.

À l'aide d'une pipette jaugée, introduire 20 ml de solution dans la colonne préparée conformément au point 4.3.1, ouvrir le robinet et faire éluer le solvant jusqu'au niveau de la couche de gel de silice.

Éluer ensuite avec 150 ml de solvant d'élution (4.2.3), en réglant le débit du solvant à la vitesse de 2 ml par minute environ (de telle sorte que 150 ml passent par la colonne en 60-70 minutes).

Recueillir l'éluat dans un ballon à fond rond de 250 ml (4.1.1) préalablement taré et pesé avec précision. Éliminer le solvant sous pression réduite (Rotavapor) et peser le résidu qui sera utilisé pour préparer la solution pour l'analyse HPLC et pour la préparation des esters méthyliques.

Après passage dans la colonne, l'échantillon doit être récupéré au moins à 90 % pour les catégories d'huile d'olive extra-vierges, vierges et raffinées normalement et à 80 % pour les huiles lampantes et les huiles de grignons.

4.4. Analyse HPLC

4.4.1. Préparation de l'échantillon pour l'analyse chromatographique

Préparer une solution à 5 % de l'échantillon à analyser en pesant 0,5 +/-0,001 g de l'échantillon dans une fiole jaugée de 10 ml et complétée à 10 ml avec le solvant de solubilisation (4.2.9).

4.4.2. Procédure

Mettre en marche le système chromatographique. Pomper du solvant d'élution (4.2.8) à un débit de 1,5 ml par minute de façon à purger l'ensemble du système. Attendre d'avoir une ligne de base stable. Injecter 10 µl des échantillons préparés selon le point 4.3.

4.4.3. Calcul et expression des résultats

Utiliser la méthode de normalisation interne, c'est-à-dire admettre que la somme des aires des pics correspondant aux triglycérides (TAG) de ECN 42 à ECN 52 est égale à 100 %. Calculer le pourcentage relatif de chaque triglycéride selon la formule:

% triglycéride = aire du pic × 100 / somme des aires des pics.

Les résultats doivent comporter au moins deux chiffres après la virgule.

Note 1: L'ordre d'élution peut être déterminé en calculant les indices d'équivalent carbone, souvent définis par la relation $ECN = CN - 2n$, dans laquelle CN est l'indice de carbone et n le nombre de doubles liaisons; il peut être calculé de manière plus précise en tenant compte de l'origine de la double liaison. Si n_o , n_l et n_{ln} sont les nombres de doubles liaisons attribuées respectivement aux acides oléique, linoléique et linoléique, l'indice d'équivalent carbone peut être calculé selon la formule:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

▼ **M13**

dans laquelle les coefficients d_o , d_l et d_{ln} peuvent être calculés à partir des triglycérides de référence. Dans les conditions énoncées dans cette méthode, la relation obtenue sera voisine de:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_l) - (2,17 n_{ln})$$

Note 2: Exemples: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333

Lichrosphere ou équivalent (Merck) 100 CH18
Art 50377.

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

$$\alpha = TR' / TR \text{ de trioléine}$$

en utilisant le temps de rétention réduit $TR' = TR - TR$ du solvant.

Le graphique représentant le logarithme α en fonction de f (nombre de doubles liaisons) permet de déterminer les valeurs de rétention pour tous les triglycérides des acides gras contenus dans les triglycérides de référence — voir figure 2.

Note 4: L'efficacité de la colonne doit permettre de séparer nettement le pic de la trilinoléine des pics des triglycérides dont le TR est proche. L'élution est effectuée jusqu'au pic ECN 52.

Note 5: Une mesure correcte des aires de tous les pics intéressants pour la présente détermination est garantie si le deuxième pic correspondant à ECN 50 est égal à 50 % du maximum de l'échelle.

4.5. Détermination de la composition des triglycérides (moles %) au départ des données relatives aux acides gras GLC

4.5.1. Détermination de la composition des acides gras

La composition des acides gras est déterminée par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode CEE décrite à l'annexe X A du règlement (CEE) n° 2568/91 au moyen d'une colonne capillaire. Les esters méthyliques sont préparés selon la méthode décrite à l'annexe X B (méthylate de sodium en solution méthanolique).

4.5.2. Acides gras intervenant dans le calcul

Les glycérides sont regroupés par leur indice d'équivalent carbone (ECN), compte tenu des équivalences suivantes entre ECN et acides gras. Seuls les acides gras ayant 16 ou 18 atomes de carbone ont été pris en considération, car ce sont les seuls qui sont importants pour l'huile d'olive.

Acide gras (AG)	Abréviation	Poids moléculaire (PM)	ECN
Acide palmitique	P	256,4	16
Acide palmitoléique	Po	254,4	14
Acide stéarique	S	284,5	18
Acide oléique	O	282,5	16
Acide linoléique	L	280,4	14
Acide linoléique	Ln	278,4	12

▼ **M13**

4.5.3. Conversion en moles du % de l'aire pour tous les acides gras

$$\left. \begin{aligned} \text{moles P} &= \frac{\% \text{ aire P}}{\text{PMP}} & \text{moles S} &= \frac{\% \text{ aire S}}{\text{PMS}} & \text{moles Po} &= \frac{\% \text{ aire Po}}{\text{PM Po}} \\ \text{moles O} &= \frac{\% \text{ aire O}}{\text{PM O}} & \text{moles L} &= \frac{\% \text{ aire L}}{\text{PM L}} & \text{moles Ln} &= \frac{\% \text{ aire Ln}}{\text{PM Ln}} \end{aligned} \right\} (1)$$

4.5.4. Normalisation des acides gras à 100 %

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% P(1,2,3)} &= \frac{\text{moles P} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% S(1,2,3)} &= \frac{\text{moles S} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% Po(1,2,3)} &= \frac{\text{moles Po} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% O(1,2,3)} &= \frac{\text{moles O} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% L(1,2,3)} &= \frac{\text{moles L} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% Ln(1,2,3)} &= \frac{\text{moles Ln} * 100}{\text{moles(P + S + Po + O + L + Ln)}} \end{aligned} \right\} (2)$$

Le résultat indique le pourcentage de chaque acide gras en moles dans la position globale (1,2,3-) des TAG.

Calculer alors la somme des acides gras saturés P et S (SAG) et les acides gras insaturés Po, O, L et Ln (AGI):

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% SAG} &= \text{moles \% P} + \text{moles \% S} \\ \text{moles \% AGI} &= 100 - \text{moles \%} \end{aligned} \right\} (3)$$

4.5.5. Calcul de la composition des TAG en acides gras en positions 2 et 1-3

Les acides gras sont répartis en trois ensembles de la manière suivante: deux ensembles identiques pour les positions 1 et 3 et un pour la position 2, avec différents coefficients pour les acides saturés (P et S) et les acides insaturés (Po, O, L et Ln).

4.5.5.1. Acides gras saturés en position 2 [P(2) et S(2)]

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% P(2)} &= \text{moles \% P (1,2,3)} * 0,06 \\ \text{moles \% S(2)} &= \text{moles \% S (1,2,3)} * 0,06 \end{aligned} \right\} (4)$$

▼ **M13**

4.5.5.2. Acides gras insaturés en position 2 [Po(2), O(2), L(2) et Ln(2)]

$$\begin{aligned}
 \text{moles \% Po(2)} &= \frac{\text{moles \% Po(1,2,3)}}{\text{moles \% AGI}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)}] \\
 \text{moles \% O(2)} &= \frac{\text{moles \% O(1,2,3)}}{\text{moles \% AGI}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)}] \\
 \text{moles \% L(2)} &= \frac{\text{moles \% L(1,2,3)}}{\text{moles \% AGI}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)}] \\
 \text{moles \% Ln(2)} &= \frac{\text{moles \% Ln(1,2,3)}}{\text{moles \% AGI}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)}]
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

4.5.5.3. Acides gras en positions 1 et 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) et Ln(1,3)]

$$\begin{aligned}
 \text{moles \% P(1,3)} &= \frac{\text{moles \% P(1,2,3)} - \text{moles \% P(2)}}{2} + \text{moles \% P(1,2,3)} \\
 \text{moles \% S(1,3)} &= \frac{\text{moles \% S(1,2,3)} - \text{moles \% S(2)}}{2} + \text{moles \% S(1,2,3)} \\
 \text{moles \% Po(1,3)} &= \frac{\text{moles \% Po(1,2,3)} - \text{moles \% Po(2)}}{2} + \text{moles \% Po(1,2,3)} \\
 \text{moles \% O(1,3)} &= \frac{\text{moles \% O(1,2,3)} - \text{moles \% O(2)}}{2} + \text{moles \% O(1,2,3)} \\
 \text{moles \% L(1,3)} &= \frac{\text{moles \% L(1,2,3)} - \text{moles \% L(2)}}{2} + \text{moles \% L(1,2,3)} \\
 \text{moles \% Ln(1,3)} &= \frac{\text{moles \% Ln(1,2,3)} - \text{moles \% Ln(2)}}{2} + \text{moles \% Ln(1,2,3)}
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

4.5.6. Calcul des triglycérides

4.5.6.1. TAG avec un acide gras (AAA, ici LLL, PoPoPo)

$$\text{moles \% AAA} = \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% A(1,3)}}{10000}
 \tag{7}$$

4.5.6.2. TAG avec deux acides gras (AAB, ici PoPoL, PoLL)

$$\begin{aligned}
 \text{moles \% AAB} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% B(1,3)} * 2}{10000} \\
 \text{moles \% ABA} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% B(2)} * \text{moles \% A(1,3)}}{10000}
 \end{aligned}
 \tag{8}$$

▼ M13

4.5.6.3. TAG avec trois acides gras différents (ABC, ici OLLn, PLLn, PoOLn, PPOln)

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% ABC} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% B(2)} * \text{moles \% C(1,3)} * 2}{10000} \\ \text{moles \% BCA} &= \frac{\text{moles \% B(1,3)} * \text{moles \% C(2)} * \text{moles \% A(1,3)} * 2}{10000} \\ \text{moles \% CAB} &= \frac{\text{moles \% C(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% B(1,3)} * 2}{10000} \end{aligned} \right\} (9)$$

4.5.6.4. Triglycérides avec ECN42

Les triglycérides suivants avec ECN42 sont calculés selon l'équation 7, 8 et 9, par ordre de l'élution attendue dans la HPLC (normalement trois pics seulement).

LLL

PoLL et l'isomère de position LPoL

OLLn et les isomères de position OLnL et LnOL

PoPoL et l'isomère de position PoLPo

PoOLn et les isomères de position OPoLn et OLnPo

PLLn et les isomères de position LLnP et LnPL

PoPoPo

SLnLn et l'isomère de position LnSLn

PPoLn et les isomères de position PLnPo et PoPLn

Les triacylglycérides avec ECN42 s'obtiennent en calculant la somme des neuf triglycérides, y compris leurs isomères de position. Les résultats doivent comporter au moins deux chiffres après la virgule.

5. Évaluation des résultats

Comparer la composition théorique calculée et celle déterminée par HPLC. Si la différence «données HPLC moins données théoriques» est supérieure aux valeurs mentionnées dans le règlement pour la catégorie d'huile appropriée, l'échantillon contient de l'huile de graines.

Note: Les résultats sont donnés avec un chiffre derrière la virgule.

6. Exemple (Les nombres se réfèrent aux sections du texte de la méthode.)

4.5.1. Calcul des acides gras par le % de moles à partir des données de la GLC (% de l'aire)

On obtient les données suivantes pour la composition en acides gras par GLC:

AG PM	P 256,4	S 284,5	Po 254,4	O 282,5	L 280,4	Ln 278,4
% de l'aire	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ M13

4.5.3. Conversion du % de l'aire en moles pour tous les acides gras

$$\text{moles P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles P} \quad \text{voir formule (1)}$$

$$\text{moles S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles S} \quad \text{voir formule (1)}$$

$$\text{moles Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles Po} \quad \text{voir formule (1)}$$

$$\text{moles O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles O} \quad \text{voir formule (1)}$$

$$\text{moles L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles L} \quad \text{voir formule (1)}$$

$$\text{moles Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ moles Ln} \quad \text{voir formule (1)}$$

$$\text{Total} = 0,35822 \text{ moles TG}$$

4.5.4. Normalisation des acides gras à 100 %

$$\text{moles \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 10,888\% \quad \text{voir formule (2)}$$

$$\text{moles \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 2,944 \% \quad \text{voir formule (2)}$$

$$\text{moles \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,097 \% \quad \text{voir formule (2)}$$

$$\text{moles \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 74,113 \% \quad \text{voir formule (2)}$$

$$\text{moles \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 9,956 \% \quad \text{voir formule (2)}$$

$$\text{moles \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,003 \% \quad \text{voir formule (2)}$$

$$\text{Total moles \%} = 100,0 \%$$

La somme des acides gras saturés et insaturés dans la position 1, 2, 3 des TAG:

$$\text{moles \% SAG} = 10,888 \% + 2,944 \% = 13,831 \% \quad \text{voir formule (3)}$$

$$\text{moles \% AGI} = 100,000 \% - 13,831 \% = 86,169 \% \quad \text{voir formule (3)}$$

4.5.5. Calcul de la composition en acides gras dans les positions 2 et 1-3 des TAG

4.5.5.1. Acides gras saturés en position 2 [P(2) et S(2)]

$$\text{moles \% P(2)} = 10,888 \% * 0,06 = 0,653 \% \quad \text{voir formule (4)}$$

$$\text{moles \% S(2)} = 2,944 \% * 0,06 = 0,177 \% \quad \text{voir formule (4)}$$

▼ **M13**

4.5.5.2. Acides gras insaturés en positions 1-3 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) et Ln(1,3)]

$$\text{moles \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 1,263 \text{ moles \%} \quad \text{voir formule (5)}$$

$$\text{moles \% O(2)} = \frac{74,113 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 85,295 \text{ moles \%} \quad \text{voir formule (5)}$$

$$\text{moles \% L(2)} = \frac{9,956 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 11,458 \text{ moles \%} \quad \text{voir formule (5)}$$

$$\text{moles \% Ln(2)} = \frac{1,003 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 1,154 \text{ moles \%} \quad \text{voir formule (5)}$$

4.5.5.3. Acides gras en positions 1-3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) et Ln(1,3)]

$$\text{moles \% P(1,3)} = \frac{10,888 - 0,659}{2} 10,888 = 16,005 \text{ moles \%} \quad \text{voir formule (6)}$$

$$\text{moles \% S(1,3)} = \frac{2,944 - 0,177}{2} 2,944 = 4,327 \text{ moles \%} \quad \text{voir formule (6)}$$

$$\text{moles \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,263}{2} 1,097 = 1,015 \text{ \% moles} \quad \text{voir formule (6)}$$

$$\text{moles \% O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,295}{2} 74,113 = 68,522 \text{ moles \%} \quad \text{voir formule (6)}$$

$$\text{moles \% L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} 9,956 = 9,205 \text{ moles \%} \quad \text{voir formule (6)}$$

$$\text{moles \% Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} 1,003 = 0,927 \text{ moles \%} \quad \text{voir formule (6)}$$

4.5.6. Calcul des triglycérides

À partir de la composition calculée en acides gras dans les positions sn-2 et sn-1,3 (voir tableau suivant):

AG en	position 1-3	position 2
P	16,005 %	0,653 %
S	4,327 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,263 %
O	68,522 %	85,295 %
L	9,205 %	11,458 %
Ln	0,927 %	1,154 %
Total	100,0 %	100,0 %

Calculer les triglycérides suivants:

LLL

PoPoPo

PoLL avec 1 isomère de position

SLnLn avec 1 isomère de position

PoPoL avec 1 isomère de position

▼ **M13**

PPoLn avec 2 isomères de position

OLLn avec 2 isomères de position

PLLn avec 2 isomères de position

PoOLn avec 2 isomères de position

4.5.6.1. TAG avec un acide gras (LLL, PoPoPo)

voir formule (7)

$$\text{moles \% LLL} = \frac{9,205 \% * 11,458 \% * 9,205 \%}{10000} = 0,09708 \text{ mol LLL}$$

$$\text{moles \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 1,015 \%}{10000} = 0,00013 \text{ mol PoPoPo}$$

4.5.6.2. TAG avec deux acides gras (PoLL, SLnLn, PoPoL)

voir formule (8)

$$\text{moles \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,02141$$

$$\text{moles \% LPoL} = \frac{9,205 \% * 1,263 \% * 9,205 \%}{10000} = 0,01070$$

0,03211 mol PoLL

$$\text{moles \% SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,327 \% * 1,154 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,00093$$

$$\text{moles \% LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10000} = 0,00002$$

0,00095 mol SLnLn

$$\text{moles \% PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,00236$$

$$\text{moles \% PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 1,015 \%}{10000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

4.5.6.3. TAG avec trois acides gras différents (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)

voir formule (9)

$$\text{moles \% PPLn} = \frac{16,005 \% * 1,263 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,00375$$

$$\text{moles \% LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10000} = 0,00012$$

$$\text{moles \% PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10000} = 0,00375$$

0,00762 mol PPLn

▼ M13

$$\text{moles \% OLLn} = \frac{68,522 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,14577$$

$$\text{moles \% LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,295 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,14577$$

$$\text{moles \% LLnO} = \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 68,522 \% * 2}{10000} = 0,14577$$

0,43671 mol OLLn

$$\text{moles \% PLLn} = \frac{16,005 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,03400$$

$$\text{moles \% LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,00111$$

$$\text{moles \% LLnP} = \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10000} = 0,03400$$

0,06911 mol PLLn

$$\text{moles \% PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,295 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,01605$$

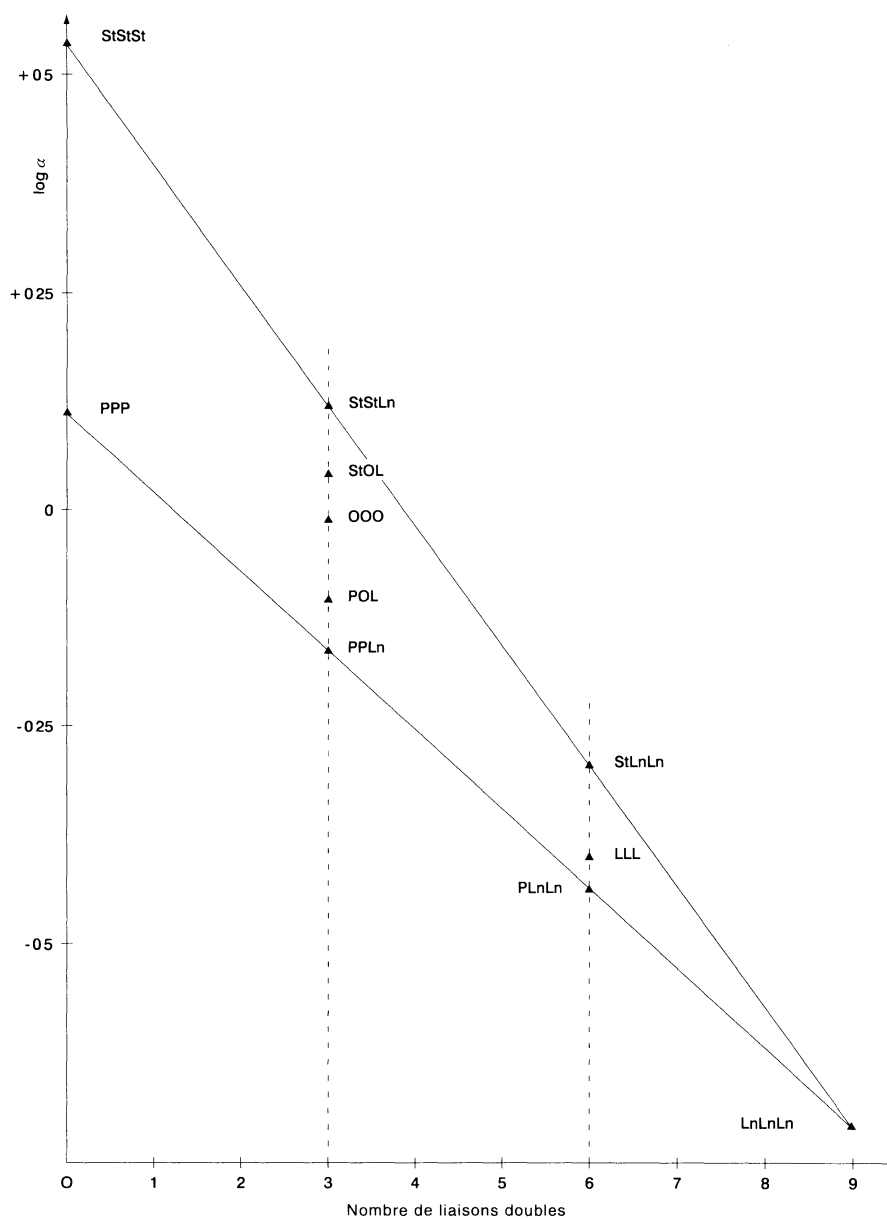
$$\text{moles \% LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,263 \% * 68,522 \% * 2}{10000} = 0,01605$$

$$\text{moles \% OLnPo} = \frac{68,522 \% * 1,154 \% * 1,015 \% * 2}{10000} = 0,01605$$

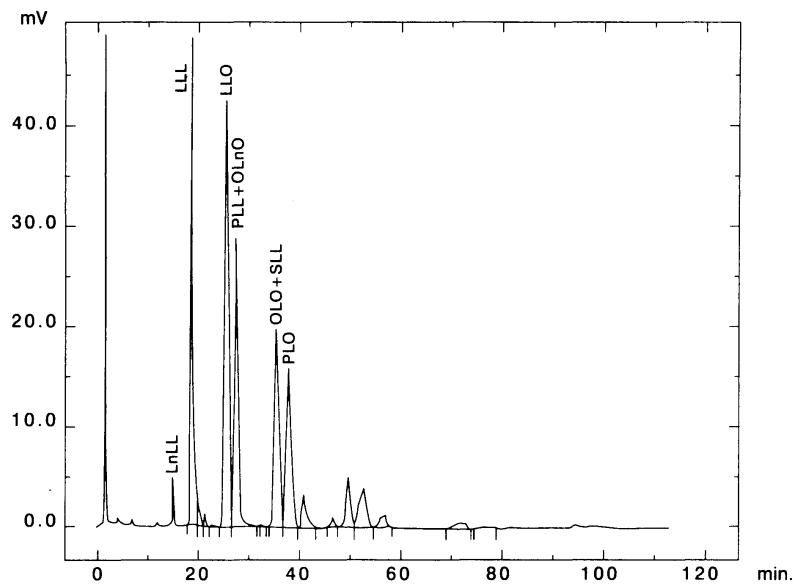
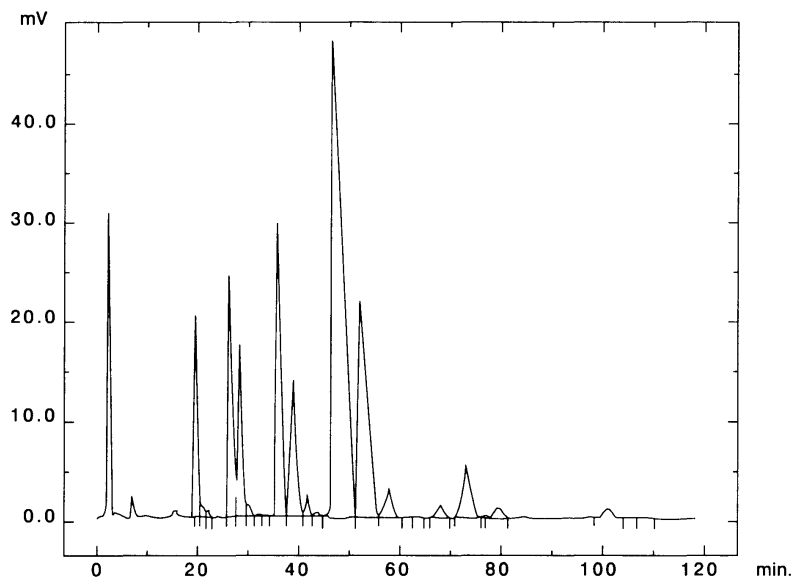
0,04815 mol PoOLn

ECN42 = 0,69540 mol TAG

▼ M14

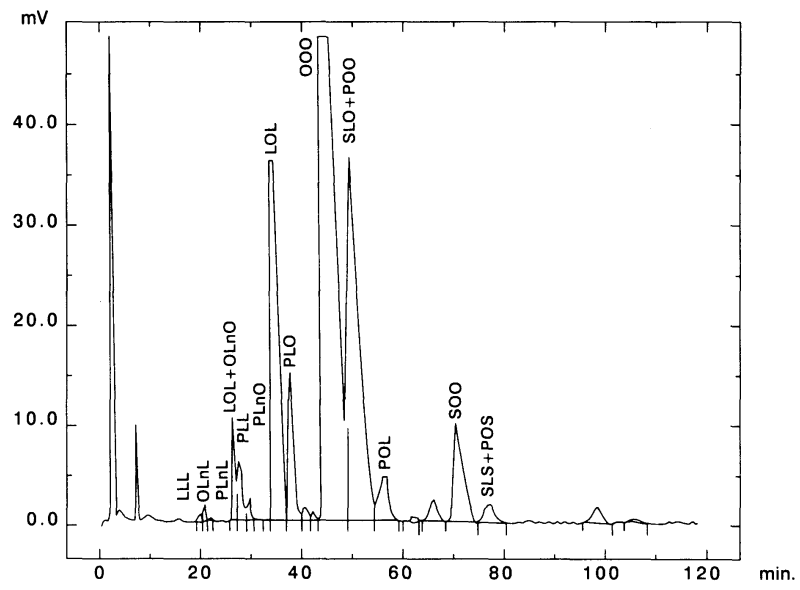
Figure 1: Évolution du $\log \alpha$ en fonction de f (nombre de liaisons doubles)

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

▼ **M14****Figure 2:** *Huile de soja***Figure 3:** *Huile de soja / huile d'olive 30/70*

▼ M14

Figure 4: Huile d'olive



▼ **M19***ANNEXE XIX***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-eicosanol 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 d'injection 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.
- 3.13. Balance de précision ayant une sensibilité de 1 mg (avec affichage 0.1 mg).

▼ M19**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.
- 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 référence 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. Hexaméthyldisilazane.
- 4.15. Triméthylchlorosilane.
- 4.16. Solution étalon de triméthylsilyléthers des alcools aliphatiques de C20 à C28. À préparer au moment de l'emploi à partir de mélanges d'alcools purs.
- 4.17. 1-eicosanol, solution à 0,1 % (m/V) dans le chloroforme (standard interne).
- 4.18. Gaz vecteur: hydrogène ou hélium pur, pour chromatographie en phase gazeuse.
- 4.19. Gaz auxiliaire: nitrogène 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 correspond 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 et 1 500 microlitres s'il s'agit d'huile de grignons d'olive.

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

▼ **M19**

5.1.2. Ajouter 50 millilitres de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 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.

5.1.4. Réunir les extraits éthérés 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 sécher sous hotte aspirante, 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. Introduire dans la cuve de développement un mélange hexane-éther éthylique 65/35 (V/V) jusqu'à une hauteur d'environ 1 centimètre ⁽¹⁾.

Fermer la cuve 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.

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

▼ M19

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 microseringue 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 cuve 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 sécher sous hotte aspirante 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.

- 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-hexaméthylidisilazane-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).

▼ M19

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.

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.

5.3.2. 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.

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'injecteur 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 atteindre 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

5.4.2.1. Les conditions opératoires indicatives 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 vecteur: hélium, 20 à 35 centimètres par seconde; hydrogène, 30 à 50 centimètres par seconde,

— rapport de division: de 1/50 à 1/100,

— sensibilité instrumentale: de 4 à 16 fois l'atténuation minimale,

▼ M19

- 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 pour l'huile d'olive 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 à 1 microlitre de la solution de l'échantillon; tirer encore le piston de la siringue 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 individuels 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 C₂₂, C₂₄, C₂₆ et C₂₈.

5.4.5.2. Calculer le contenu en chaque alcool aliphatique individuel, en milligrammes pour 1 000 grammes de matière grasse, comme suit:

$$\text{Alcool } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

où:

A_x = aire du pic de l'alcools x

A_s = aire du pic d'1-eicosanol

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

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

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Rapporter les contenus en alcools aliphatiques simples en milligrammes pour 1 000 grammes de matière grasse et leur somme comme «alcools aliphatiques totaux».

▼ **M19***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/t_M , où L est la longueur de la colonne en centimètres et tM le temps chronométré en secondes.

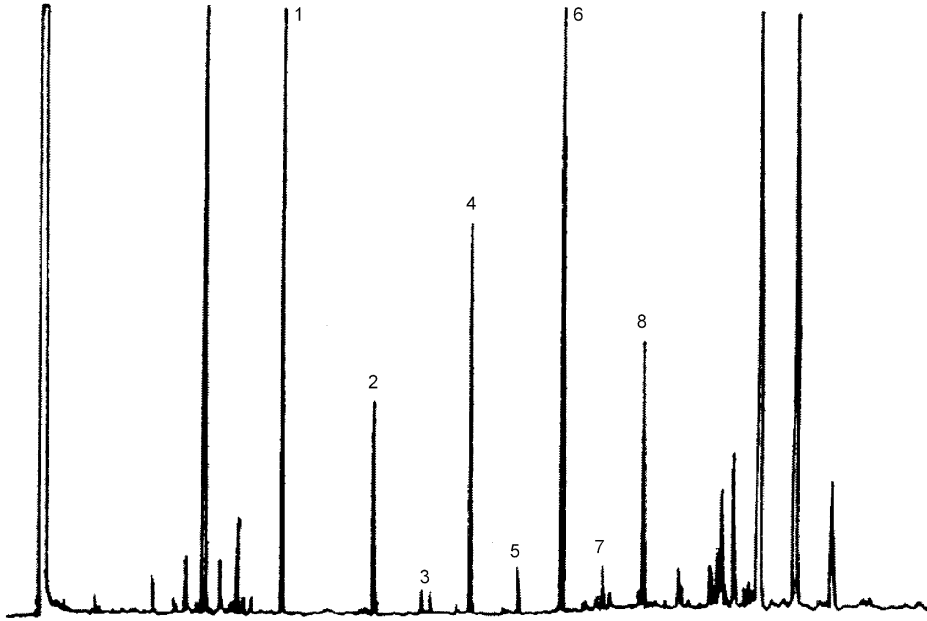


Figure 1 — Chromatogramme de la fraction alcoolique d'une huile vierge

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

▼ **M23**

ANNEXE XX

Méthode de détermination de la teneur en cires et en esters méthyliques et éthyliques d'acides gras par chromatographie gazeuse sur colonne capillaire

1. OBJET

Cette méthode décrit un procédé pour déterminer la teneur en cires et en esters méthyliques et éthyliques d'acides gras dans les huiles d'olive. Les cires et les alkyls esters sont séparés en fonction du nombre d'atomes de carbone. La méthode peut être employée notamment pour différencier l'huile d'olive de l'huile de grignons d'olive et comme paramètre de qualité pour les huiles d'olive vierges extra, dans la mesure où elle permet la détection des mélanges frauduleux d'huiles d'olive vierge extra avec des huiles de qualité inférieure, notamment les huiles d'olive vierges, lampantes ou désodorisées.

2. PRINCIPE

L'huile, additionnée d'étalons internes appropriés, est fractionnée par chromatographie sur colonne de gel de silice hydraté ; la fraction éluée dans les conditions de l'essai (à polarité inférieure à celle des triglycérides) est recueillie puis analysée directement par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

3. APPAREILLAGE

3.1. **Erlenmeyer de 25 ml.**

3.2. **Colonne en verre** pour chromatographie en phase liquide, diamètre intérieur 15,0 mm, hauteur 30 à 40 cm, équipée d'un robinet approprié.

3.3. **Appareil de chromatographie en phase gazeuse** approprié pour le fonctionnement avec colonne capillaire, équipé d'un système d'injection directe sur colonne, constitué des éléments suivants:

3.3.1. **Four à thermostat équipé d'un programmeur de température.**

3.3.2. **Injecteur à froid** pour introduction directe dans la colonne

3.3.3. **Détecteur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur.**

3.3.4. **Enregistreur-intégrateur** (Note 1) approprié pour fonctionner avec le convertisseur-amplificateur (point 3.3.3), vitesse de réponse non supérieure à 1 seconde et vitesse de déroulement du papier variable.

Note 1: Il est également possible d'utiliser des systèmes informatisés qui permettent la saisie des données de chromatographie en phase gazeuse au moyen d'un ordinateur.

3.3.5. **Colonne capillaire, silice fondue (pour analyse des cires et des esters méthyliques et éthyliques)**, longueur 8 à 12 m, diamètre intérieur 0,25 à 0,32 mm, recouverte à l'intérieur de liquide de répartition (Note 2) à l'épaisseur uniforme comprise entre 0,10 et 0,30 μm .

Note 2: Il existe des phases liquides dans le commerce qui peuvent être utilisées à cette fin, telles que SE52 ou SE 54.

3.4. **Microseringue** de 10 μl , équipée d'une aiguille en acier trempé, pour injection directe sur colonne.

3.5. **Agitateur électrique.**

3.6. **Évaporateur rotatif.**

3.7. **Four à moufle.**

3.8. Balance **analytique** garantissant une précision de la mesure de $\pm 0,1$ mg.

▼ M23

3.9. Verrerie normale de laboratoire.

4. RÉACTIFS

4.1. **Gel de silice**, d'une granulométrie comprise entre 60 et 200 µm mesh [NdT: les deux unités de mesure coexistent dans l'original]. Le gel de silice doit être placé dans le four à moufle à 500 °C pendant au moins 4 h. Après refroidissement, y ajouter 2 % d'eau par rapport à la quantité de gel de silice utilisée. Agiter convenablement afin d'homogénéiser la suspension. Conserver dans le dessiccateur pendant au moins 12 heures avant emploi.

4.2. **n-hexane**, pour chromatographie ou analyse de résidus (la pureté doit être vérifiée).

AVERTISSEMENT: risques d'inflammation des vapeurs. Tenir à l'écart de sources de chaleur, étincelles ou flammes nues. Bien fermer les récipients et utiliser dans un local bien aéré. Éviter l'accumulation de vapeurs et éliminer toute cause possible d'incendie, telle que radiateurs et appareils électriques non antidéflagrants. Nocif par inhalation: peut nuire aux cellules du système nerveux. Éviter de respirer les vapeurs. Utiliser si nécessaire un appareil respiratoire adéquat. Éviter tout contact avec les yeux et la peau.

4.3. **Éther éthylique, pour chromatographie.**

AVERTISSEMENT: extrêmement inflammable. Modérément toxique. Irritant pour la peau. Nocif par inhalation. Peut être nuisible pour les yeux. Les effets peuvent être différés. Risque de formation de peroxydes explosifs. Risques d'inflammation des vapeurs. Tenir à l'écart de sources de chaleur, étincelles ou flammes nues. Bien fermer les récipients et utiliser dans un local bien aéré. Éviter l'accumulation de vapeurs et éliminer toute cause possible d'incendie, telle que radiateurs et appareils électriques non antidéflagrants. Ne pas évaporer jusqu'à dessiccation totale ou quasi totale. L'adjonction d'eau ou d'un autre agent réducteur approprié peut réduire la formation des peroxydes. Ne pas ingérer. Éviter de respirer les vapeurs. Éviter le contact prolongé ou répété avec la peau.

4.4. **n-heptane**, pour chromatographie, ou **iso-octane**.

AVERTISSEMENT: inflammable. Nocif par inhalation. Tenir à l'écart de sources de chaleur, étincelles ou flammes nues. Bien fermer les récipients et utiliser dans un local bien aéré. Éviter de respirer les vapeurs. Éviter le contact prolongé ou répété avec la peau.

4.5. **Solution étalon d'arachidate laurique** (*Note 3*), diluée à 0,05 % (m/V) dans de l'heptane (étalon interne pour cires).

Note 3: Il est également possible d'utiliser du palmitate de palmityle, du stéarate de myristyle ou du lauréate d'arachidyle.

4.6. **Solution étalon d'heptadécanoate méthylique, diluée à 0,02 % (m/V) dans de l'heptane (étalon interne pour esters méthyliques et éthyliques).**

4.7. **Soudan 1 (1-phényl-azo-2-naphthol)**

▼ **M23**4.8. **Gaz vecteur: hydrogène ou hélium, pur, pour chromatographie en phase gazeuse.**

AVERTISSEMENT:

Hydrogène. extrêmement inflammable, sous pression. Tenir à l'écart de sources de chaleur, étincelles ou flammes nues ou d'appareils électriques non antidéflagrants. S'assurer que la soupape de la bouteille est bien fermée lorsqu'elle n'est pas utilisée. Utiliser exclusivement avec un réducteur de pression. Desserrer le ressort du réducteur avant l'ouverture de la soupape de la bouteille. S'éloigner du point de sortie du gaz de la bouteille au moment de l'ouverture de la soupape. Utiliser dans un local bien aéré. Ne pas transférer l'hydrogène d'une bouteille à une autre. Ne pas mélanger de gaz dans la bouteille. S'assurer que les bouteilles ne risquent pas de tomber. Éloigner les bouteilles des rayons du soleil ou de toute autre source de chaleur. Ne pas stocker dans des espaces corrosifs. Ne pas utiliser de bouteilles abîmées ou sans étiquette.

Hélium. comprimé sous haute pression. Réduit l'oxygène disponible pour la respiration. Conserver le conteneur fermé. Utiliser dans un local bien aéré. Ne pas entrer dans les locaux de stockage s'ils ne sont pas bien ventilés. Utiliser exclusivement avec un réducteur de pression. Desserrer le ressort du réducteur avant l'ouverture de la soupape de la bouteille. Ne pas transférer le gaz d'une bouteille à une autre. S'assurer que les bouteilles ne risquent pas de tomber. S'éloigner du point de sortie du gaz de la bouteille au moment de l'ouverture de la soupape. Éloigner les bouteilles des rayons du soleil ou de toute autre source de chaleur. Ne pas stocker dans des espaces corrosifs. Ne pas utiliser de bouteilles abîmées ou sans étiquette. Ne pas inhaler. Utiliser exclusivement à des fins techniques.

4.9. **Gaz auxiliaires:**

— hydrogène pur, pour chromatographie en phase gazeuse.

— air pur, pour chromatographie en phase gazeuse.

AVERTISSEMENT:

Air. Comprimé sous haute pression. Utiliser avec précaution en présence de substances combustibles car la température d'auto-allumage de la plupart des composés organiques dans l'air diminue fortement à haute pression. S'assurer que la soupape de la bouteille est bien fermée lorsqu'elle n'est pas utilisée. Utiliser exclusivement avec un réducteur de pression. Desserrer le ressort du réducteur avant l'ouverture de la soupape de la bouteille. S'éloigner du point de sortie du gaz de la bouteille au moment de l'ouverture de la soupape. Ne pas transférer le gaz d'une bouteille à une autre. Ne pas mélanger de gaz dans la bouteille. S'assurer que les bouteilles ne risquent pas de tomber. Éloigner les bouteilles des rayons du soleil ou de toute autre source de chaleur. Ne pas stocker dans des espaces corrosifs. Ne pas utiliser de bouteilles abîmées ou sans étiquette. Ne pas inhaler et ne pas utiliser pour des appareils respiratoires l'air destiné à des fins techniques.

5. **MODE OPÉRATOIRE**5.1. **Préparation de la colonne chromatographique**

Mettre 15 g de gel de silice (point 4.1) en suspension dans le n-hexane (point 4.2) et l'introduire dans la colonne (point 3.2). Laisser se déposer spontanément, puis utiliser un agitateur électrique pour rendre la couche chromatographique plus homogène. Filtrer 30 ml de n-hexane afin d'éliminer les impuretés éventuelles. Peser exactement à l'aide de la balance analytique (point 3.8) environ 500 mg de l'échantillon dans l'Erlenmeyer de 25 ml (point 3.1). Ajouter une quantité appropriée d'étalon interne (point 4.5), en fonction du contenu présumé de cires. Par exemple, ajouter 0,1 mg d'arachidate laurique dans le cas de l'huile d'olive et 0,25 à 0,5 mg dans le cas de l'huile de grignons d'olive et 0,05 mg de heptadécanoate méthylique dans le cas des huiles d'olive (point 4.6).

▼ **M23**

Introduire l'échantillon ainsi préparé dans la colonne chromatographique à l'aide de deux fractions de 2 ml de n-hexane (point 4.2.).

Laisser couler le solvant jusqu'à 1 mm au-dessus du niveau supérieur de l'absorbant. Filtrer [NdT: passage manquant dans l'original] supplémentaires de n-hexane/éther éthylique (99:1) et recueillir 220 ml à un débit d'environ 15 gouttes toutes les 10 secondes. **(Cette fraction contient les esters méthyliques et éthyliques et les cires).** (Note 4) (Note 5).

Note 4: Un nouveau mélange n-hexane/éther éthylique (99:1) doit être préparé chaque jour.

Note 5: Pour contrôler visuellement l'élution correcte des cires, il est possible d'ajouter à la solution échantillon 100 µl de colorant soudan I dilué à 1 % dans le mélange d'élution.

Le colorant ayant un temps de rétention compris entre celui des cires et des triglycérides, il convient de suspendre l'élution lorsque le colorant atteint le fond de la colonne chromatographique, car toutes les cires ont alors été éluées.

Évaporer les fractions ainsi obtenues dans l'évaporateur rotatif jusqu'à l'évacuation pratiquement totale du solvant. Les 2 derniers ml sont évacués avec un faible flux d'azote. Recueillir la fraction contenant les esters méthyliques et éthyliques est diluée avec 2 à 4 ml de n-heptane ou d'iso-octane [NdT: cette phrase est entachée d'une erreur de syntaxe dans l'original].

5.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

5.2.1. Opérations préliminaires

Connecter la colonne et le chromatographe en phase gazeuse (point 3.3), en raccordant, d'une part, le point d'admission au système sur colonne et, d'autre part, le point de sortie au détecteur. Vérifier le bon fonctionnement de l'appareillage de chromatographie en phase gazeuse (fonctionnement des circuits des gaz, efficacité du système de détection et d'enregistrement, etc.).

Si la colonne est utilisée pour la première fois, il est recommandé de procéder à son conditionnement. Laisser s'écouler un léger débit de gaz à travers la colonne, puis allumer l'appareil de chromatographie en phase gazeuse. Chauffer graduellement jusqu'à atteindre, au bout d'environ 4 heures, une température de 350 °C.

Maintenir cette température pendant au moins 2 heures, puis régler l'appareillage sur les conditions opératoires (réglage du débit de gaz, allumage de la flamme, raccordement à l'enregistreur électronique (point 3.3.4), réglage de la température du four en fonction de la colonne, réglage du détecteur, etc.) et enregistrer le signal à une sensibilité au moins deux fois supérieure à celle requise pour l'analyse. Le tracé de la ligne de base doit être linéaire, exempt de tout pic, et ne doit présenter aucune déviation.

Une déviation rectiligne négative indique que les raccordements de la colonne sont mauvais; une déviation positive indique un conditionnement inadéquat de la colonne.

5.2.2. Choix des conditions opératoires pour les cires et les esters éthyliques et méthyliques (Note 6)

Les conditions opératoires sont en général les suivantes:

— température de la colonne:

20 °C/min 5 °C/min

80 °C au départ (1 minute) ————— 140 °C —————
335 °C (20)

— température du détecteur: 350 °C.

— quantité injectée: 1 µl de solution de n-heptane (2-4 ml).

▼ **M23**

- gaz vecteur: hélium ou hydrogène à la vitesse linéaire optimale pour le gaz choisi (voir Appendice A).
- sensibilité instrumentale: telle qu'elle permet de satisfaire aux conditions ci-dessus.

Note 6: En raison de la température finale élevée, on admet une déviation positive qui ne doit toutefois pas être supérieure à 10 % de la valeur réelle.

Ces conditions peuvent être modifiées de façon à les adapter aux caractéristiques de la colonne et de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, afin de séparer toutes les cires et tous les esters éthyliques et méthyliques d'acides gras et d'obtenir une séparation satisfaisante des pics (voir figures 2, 3 et 4) et un temps de rétention de l'étalon interne d'arachidate laurique de 18 ± 3 minutes. Le pic des cires le plus représentatif doit être supérieur à 60 % de l'amplitude réelle, tandis que l'étalon interne d'heptadécanoate méthylique pour les esters méthyliques et éthyliques doit atteindre l'amplitude réelle.

Les paramètres d'intégration des pics doivent être déterminés de façon à obtenir une évaluation correcte des aires des pics pris en considération.

5.3. Exécution de l'analyse

Prélever 10 µl de la solution à l'aide de la microsiringue de 10 µl; tirer le piston de la siringue en arrière jusqu'à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille dans le dispositif d'injection et après 1-2 secondes, injecter rapidement. Au bout d'environ 5 secondes, extraire délicatement l'aiguille.

Effectuer l'enregistrement jusqu'à l'élution complète des cires ou des stigmastadiènes, selon la fraction analysée.

La ligne de base doit toujours satisfaire aux conditions requises.

5.4. Identification des pics

Les différents pics sont identifiés en comparant les temps de rétention et les mélanges de cires dont les temps de rétention sont connus du fait qu'ils ont été analysés dans les mêmes conditions. Les alkyl esters sont identifiés à partir de mélanges d'esters méthyliques et éthyliques des principaux acides gras contenus dans l'huile d'olive (palmitique et oléique).

La Figure 1 représente un chromatogramme des cires d'une huile d'olive vierge. Les figures 2 et 3 représentent les chromatogrammes de deux huiles d'olive vierges extra disponibles dans le commerce, l'une contenant des esters méthyliques et éthyliques et l'autre non. La figure 4 représente le chromatogramme d'une huile d'olive vierge extra de qualité optimale et le chromatogramme de la même huile, mais qui contient des pics correspondant à 20 % d'huile désodorisée.

5.5. Analyse quantitative des cires

Procéder au calcul de l'aire des pics correspondant à l'étalon interne d'arachidate laurique et aux esters aliphatiques de C₄₀ à C₄₆ à l'aide de l'intégrateur.

Calculer la teneur totale en cires en additionnant chaque cire, en mg/kg de matière grasse, par la formule:

$$\text{Cires, mg/kg} = \frac{(A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ **M23**

où:

A_x = aire correspondant au pic de chaque ester, en données de comptage sous forme numérique

A_s = aire correspondant au pic de l'étalon interne d'arachidate laurique, en données de comptage sous forme numérique

m_s = masse de l'étalon interne d'arachidate laurique ajouté, en milligrammes

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

5.5.1. *Analyse quantitative des esters méthyliques et éthyliques*

Procéder au calcul des aires des pics correspondant à l'étalon interne d'heptadécanoate méthylique, aux esters méthyliques des acides gras C_{16} et C_{18} et aux esters éthyliques des acides gras C_{16} et C_{18} à l'aide de l'intégrateur.

Calculer la teneur de chacun des alkyl esters, en mg/kg de matière grasse, par la formule:

$$\text{Ester, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

où:

A_x = aire correspondant au pic de chaque ester C_{16} et C_{18} , en données de comptage sous forme numérique

A_s = aire correspondant au pic de l'étalon interne d'heptadécanoate méthylique, en données de comptage sous forme numérique

m_s = masse de l'étalon interne d'heptadécanoate méthylique ajouté, en milligrammes

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

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Indiquer la somme des teneurs en cires de C_{40} à C_{46} (*Note 7*), en mg/kg de matière grasse.

Indiquer la somme des teneurs en esters méthyliques et éthyliques de C_{16} à C_{18} , et le total des deux.

Il convient d'indiquer les résultats en arrondissant au mg/kg inférieur ou supérieur.

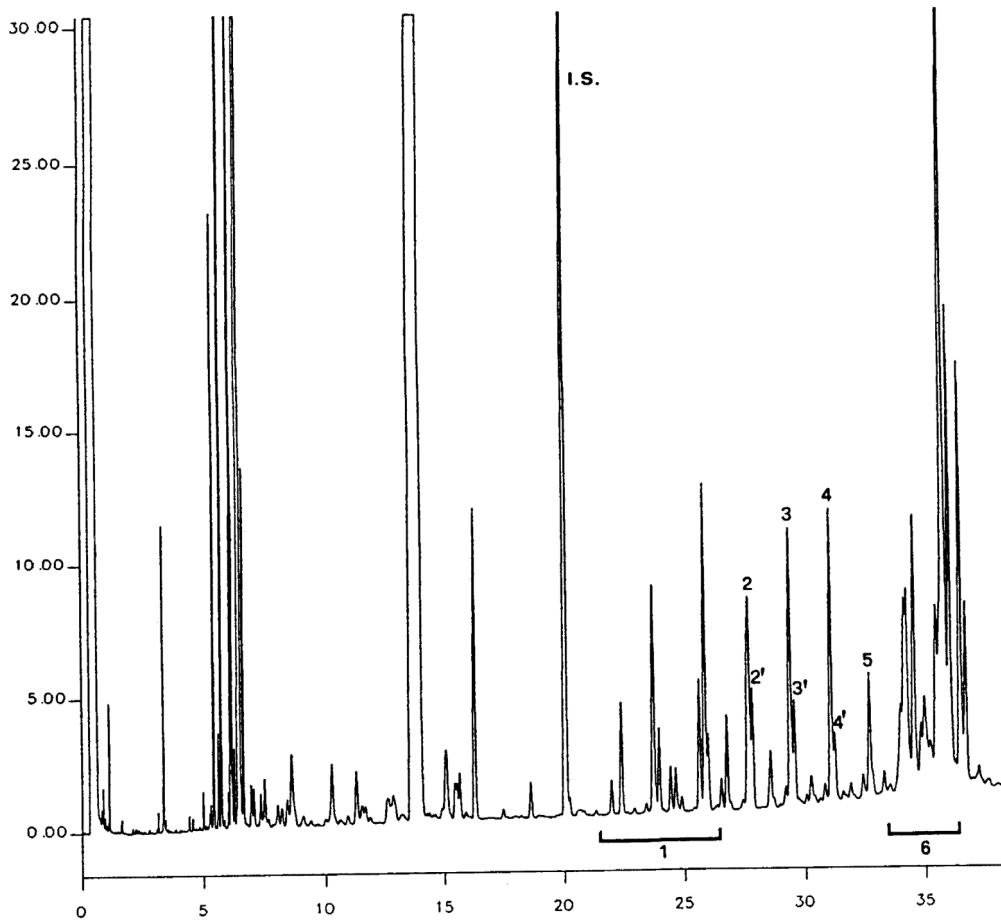
Note 7: Les constituants à quantifier correspondent aux pics des esters C_{40} à C_{46} ayant un nombre d'atomes de carbone pair, selon l'exemple de chromatogramme des cires contenues dans une huile d'olive reproduit dans la figure ci-après. À des fins d'identification, si l'ester C_{46} est scindé, il est conseillé d'analyser la fraction des cires d'une huile de grignons d'olive dont le pic C_{46} est clairement identifiable du fait qu'il prédomine.

Indiquer le ratio entre les esters éthyliques et les esters méthyliques.

▼ M23

Figure 1

Chromatogramme de la fraction de cires d'une huile d'olive, à titre d'exemple ⁽¹⁾



Pics avec un temps de rétention de 5 à 8 min des esters éthyliques et méthyliques d'acides gras

Légende:

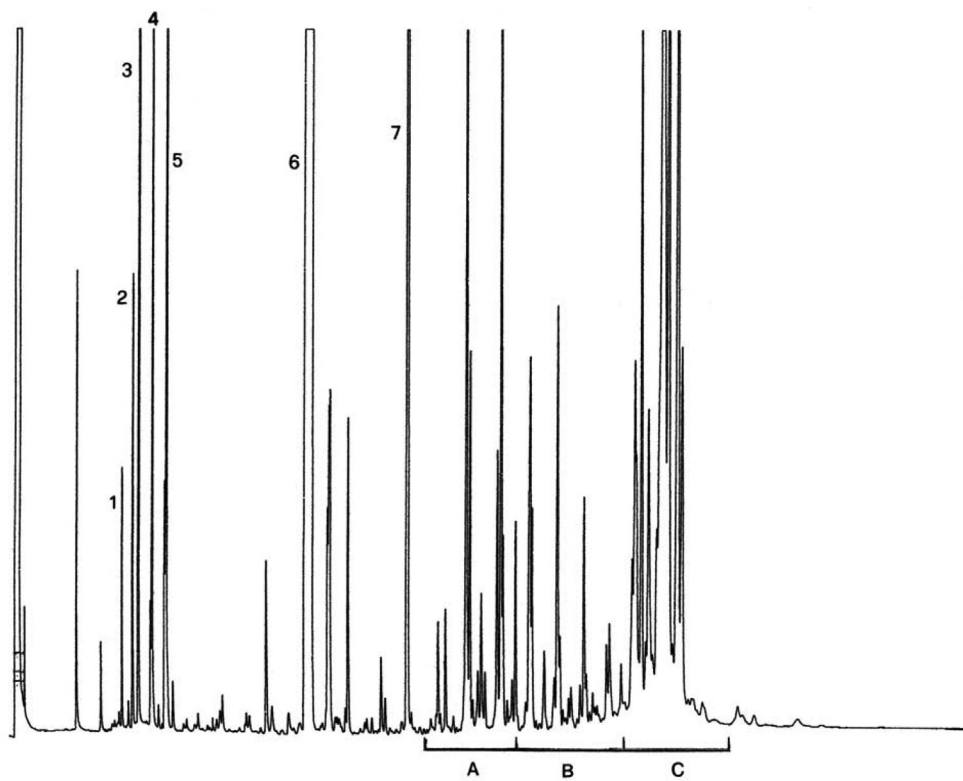
- I.S. = Arachidate laurique
- 1 = Esters diterpéniques
- 2+2' = esters C₄₀
- 3+3' = esters C₄₂
- 4+4' = esters C₄₄
- 5 = esters C₄₆
- 6 = Esters stéroliques et alcools triterpéniques

⁽¹⁾ Après l'éluion des esters stéroliques, le chromatogramme ne devrait pas présenter de pics significatifs (triglycérides).

▼ **M23**

Figure 2

Esters méthyliques, esters éthyliques et cires dans une huile d'olive vierge



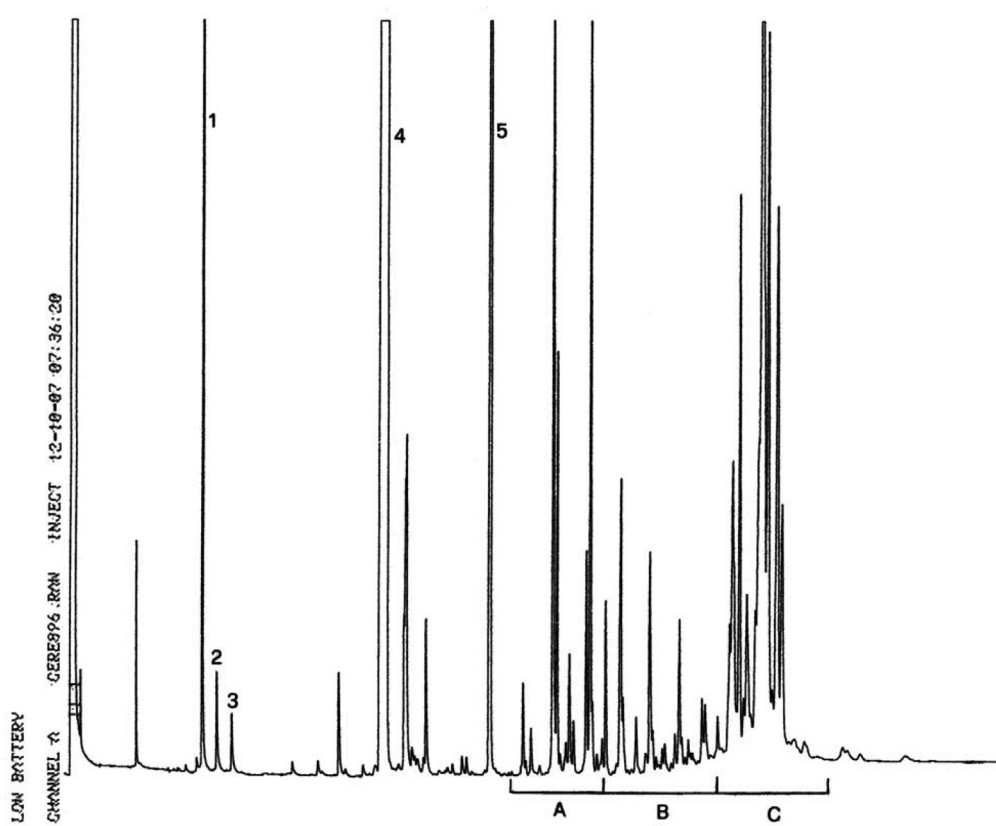
Légende:

- 1 - Méthyl C₁₆
- 2 - Éthyl C₁₆
- 3 - Heptadécanoate méthylique I.S.
- 4 - Méthyl C₁₈
- 5 - Éthyl C₁₈
- 6 - Squalene
- 7 - Arachidate laurique I.S.
- A - Esters diterpéniques
- B - Cires
- C - Esters stéroliques et esters triterpéniques

▼ M23

Figure 3

Esters méthyliques, esters éthyliques et cires dans une huile d'olive vierge extra



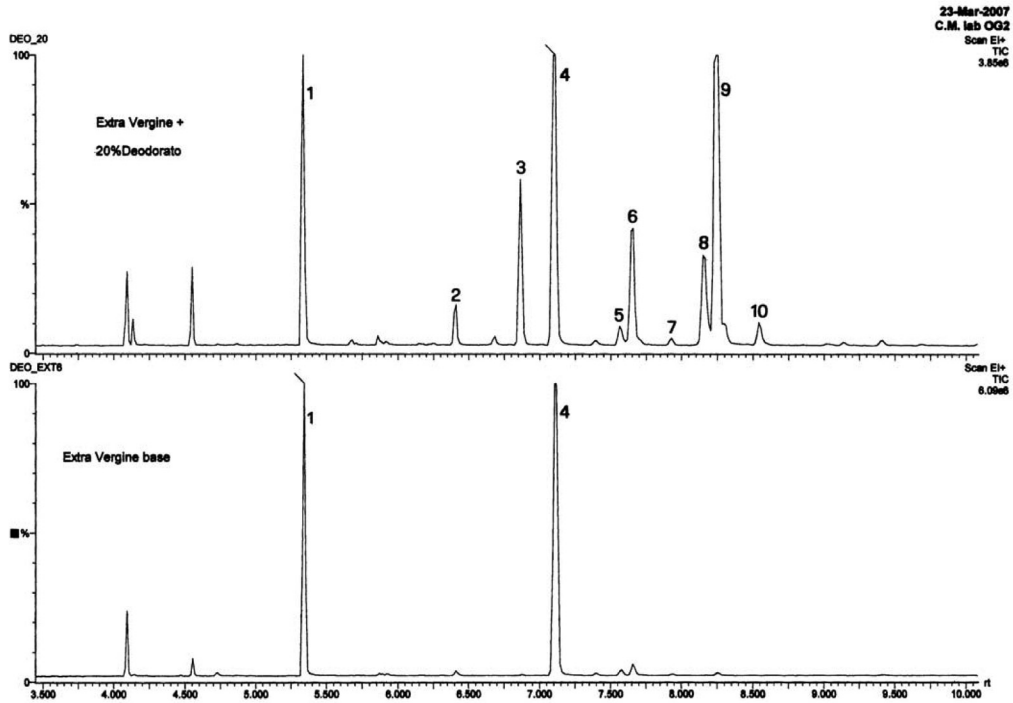
Légende:

- 1 - Heptadécanoate méthylique I.S.
- 2 - Méthyl C₁₈
- 3 - Éthyl C₁₈
- 4 - Squalène
- 5 - Arachidate laurique I.S.
- A - Esters diterpéniques
- B - Cires
- C - Esters stéroliques et esters triterpéniques

▼ M23

Figure 4

Partie d'un chromatogramme d'une huile d'olive vierge extra et de la même huile contenant des pics d'huile désodorisée



Légende:

- 1 – Myristate méthylique I.S.
- 2 – Palmitate méthylique
- 3 – Palmitate éthylique
- 4 – Heptadécanoate méthylique I.S.
- 5 – Linoléate méthylique
- 6 – Oléate méthylique
- 7 – Stéarate méthylique
- 8 – Linoléate éthylique
- 9 – Oléate éthylique
- 10 – Stéarate éthylique

▼ M23*Appendice A***Détermination de la vitesse linéaire du gaz**

Injecter de 1 à 3 µl de méthane (ou propane) dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, après l'avoir réglé sur les conditions opératoires normales. Chronométrer le temps mis par le gaz pour parcourir la colonne, depuis son injection jusqu'à l'apparition du pic (t_M).

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