

RÈGLEMENT (CE) N° 702/2007 DE LA COMMISSION**du 21 juin 2007****modifiant le règlement (CEE) n° 2568/91 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 européenne,

vu le règlement (CE) n° 865/2004 du Conseil du 29 avril 2004 portant organisation commune des marchés dans le secteur de l'huile d'olive et des olives de table et modifiant le règlement (CEE) n° 827/68 ⁽¹⁾, et notamment son article 5, paragraphe 3,

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement (CEE) n° 2568/91 de la Commission ⁽²⁾ définit les caractéristiques physiques et chimiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive et les méthodes d'évaluation de ces caractéristiques. Ces méthodes ainsi que les valeurs limites relatives aux caractéristiques des huiles doivent être mises à jour en tenant compte de l'avis des experts chimistes et en cohérence avec les travaux accomplis dans le cadre du Conseil oléicole international.
- (2) Les experts chimistes ont en particulier estimé que la quantification du pourcentage du 2-glycéryl monopalmitate est plus précise pour la détection des huiles estérifiées. La diminution de la valeur limite pour le stigmas-tadiène dans les huiles d'olive vierges permet également une meilleure séparation des huiles d'olive vierges et raffinées.
- (3) Pour permettre une période d'adaptation aux nouvelles normes et la mise en place des moyens nécessaires à leur application, ainsi que pour ne pas causer de perturbation dans les transactions commerciales, il convient de reporter l'application du présent règlement jusqu'au 1^{er} janvier 2008. Pour les mêmes raisons il convient de prévoir que les huiles d'olive et de grignons d'olive léga-

lement fabriquées et étiquetées dans la Communauté ou légalement importées dans la Communauté et mises en libre pratique avant ladite date puissent être commercialisées jusqu'à l'épuisement des stocks.

- (4) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité de gestion pour huile d'olive et les olives de table,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Le règlement (CEE) n° 2568/91 est modifié comme suit:

- 1) À l'article 2, paragraphe 1, le sixième tiret est remplacé par le texte suivant:
«— pour la détermination du pourcentage du 2-glycéryl monopalmitate, la méthode reprise à l'annexe VII,»
- 2) Les annexes sont modifiées conformément à l'annexe du présent règlement.

*Article 2*Le présent règlement entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.Le présent règlement est applicable à partir du 1^{er} janvier 2008.Toutefois, les produits ayant été légalement fabriqués et étiquetés dans la Communauté ou légalement importés dans la Communauté et mis en libre pratique avant le 1^{er} janvier 2008 peuvent être commercialisés jusqu'à l'épuisement des stocks.

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

Fait à Bruxelles, le 21 juin 2007.

Par la Commission

Mariann FISCHER BOEL

Membre de la Commission

⁽¹⁾ JO L 161 du 30.4.2004, p. 97; rectifié au JO L 206 du 9.6.2004, p. 37.

⁽²⁾ JO L 248 du 5.9.1991, p. 1. Règlement modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 1989/2003 (JO L 295 du 13.11.2003, p. 57).

ANNEXE

Les annexes du règlement (CEE) n° 2568/91 sont modifiées comme suit:

1) Le sommaire est modifié comme suit:

a) le titre de l'annexe II est remplacé par le titre suivant:

«Détermination des acides gras libres, méthode à froid»;

b) le titre de l'annexe VII est remplacé par le titre suivant:

«Détermination du pourcentage du 2-glycéryl monopalmitate».

2) L'annexe I est remplacée par le texte suivant:

«ANNEXE I

CARACTÉRISTIQUES DES HUILES D'OLIVE

Catégorie	Acidité (%) (*)	Indice de peroxyde mEq O ₂ /kg (*)	Cires mg/kg (**)	2 glyceril monopalmitate (%)	Stigmas-tadiène 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	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % Acide palmitique total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % Acide palmitique total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Huile d'olive vierge	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % Acide palmitique total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % Acide palmitique total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Huile d'olive lampante	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 si % Acide palmitique total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % Acide palmitique total > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (2)	—
4. Huile d'olive raffinée	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 si % Acide palmitique total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % Acide palmitique total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Huile d'olive — composée d'huiles d'olive raffinées et d'huiles d'olive vierges	≤ 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 pourraient (ou pas) être séparés par colonne capillaire.
(2) Ou lorsque la médiane des défauts est inférieure ou égale à 2,5 et la médiane du fruité est égale à 0.
(3) Les huiles avec une teneur en cires comprise entre 300 mg/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 300 mg/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.

Catégorie	Teneur en acides ⁽¹⁾					Sommes des isomères transo-léiques (%)	Sommes des isomères transo-léiques + transo-noléiques (%)	Composition des stérols						Stérols totaux (mg/kg)	Erythrodiol et uvaol (%) ^(**)
	Myristique (%)	Linoléique (%)	Arachidique (%)	Eicosénoïque (%)	Béhnique (%)	Lignocérique (%)		Cholestérol (%)	Brassicastérol (%)	Campésterol (%)	Stigmasterol (%)	Bétasitostérol (%) ⁽²⁾	Delta-7-Stigmastérol (%)		
1. Huile d'olive vierge extra	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 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	≤ 0,5	≤ 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	≤ 0,5	≤ 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	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Huile d'olive-composée d'huiles d'olive raffinées et d'huiles d'olive vierges	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 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	≤ 0,5	≤ 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	≤ 0,5	≤ 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	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

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

⁽²⁾ Somme de: Delta-5-23-Stigmastadiénol+Cholestérol+Béta-Sitostérol+Sitostanol+Delta-5-Avenastérol+Delta-5-24-Stigmastadiénol.

⁽³⁾ Les huiles avec une teneur en cires comprise entre 300 mg/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 300 mg/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:

a) Les résultats des analyses doivent être exprimés en indiquant le même nombre de décimales que ceux prévus pour chaque caractéristique

b) Le dernier chiffre doit être augmenté d'une unité si le chiffre suivant dépasse 4.

c) 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.

d) 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.

e) Les caractéristiques indiquées avec deux astérisques (**) se réfèrent à la qualité de l'huile et impliquent que, pour toutes les huiles de grignons d'olive, les limites y relatives peuvent ne pas être simultanément respectées.»

- 3.5. Vibrateur 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.
- 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.

- 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 $22\text{ °C} \pm 4$.

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.).

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 ne doit pas être supérieure à 10 % du fond 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.

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:

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

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.

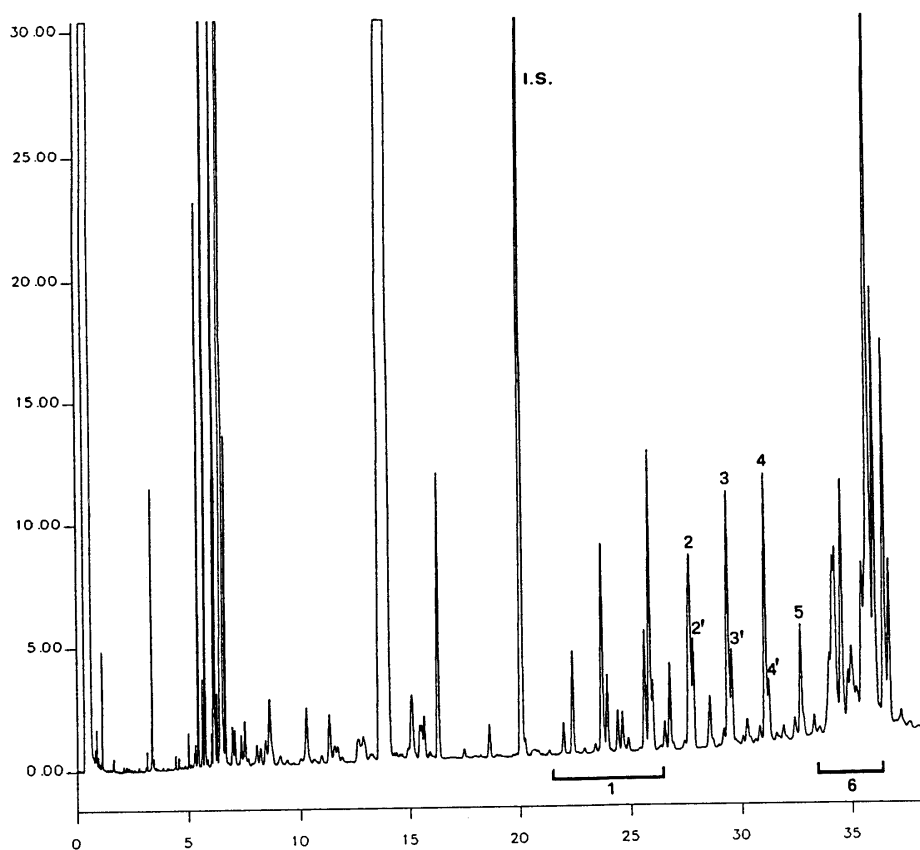
6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

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.

Figure

Chromatogramme des cires d'une huile d'olive (*)*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

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

*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.»

6) L'annexe VII est remplacée par le texte suivant:

«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
- 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. Phénolphthaléine, 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, trimethylchlorosilane 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-trimethylsilyl trifluoracetamide + 1 % trimethylchlorosilane, 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.
- 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'extract récupéré

[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 microsiringue.

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

- 5.3.1. À l'aide d'une microsiringue, 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),
- 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.

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 %)

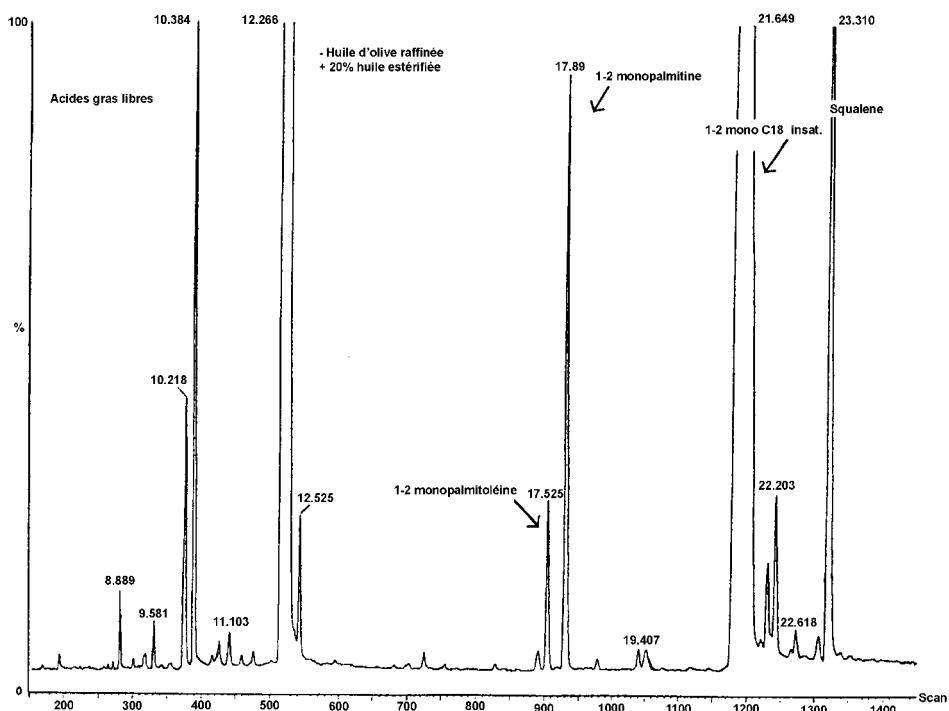
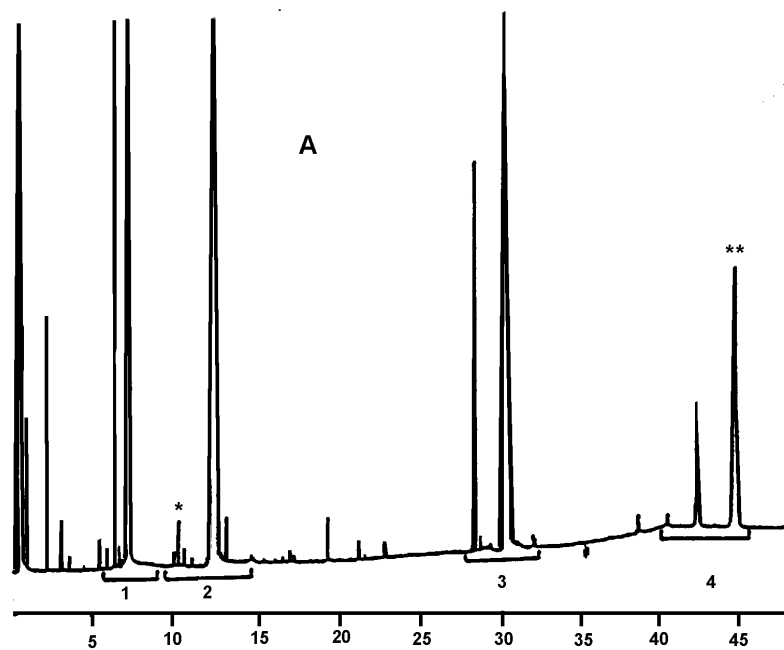


Figure 2

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 diglycérade ou peu de temps après.

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



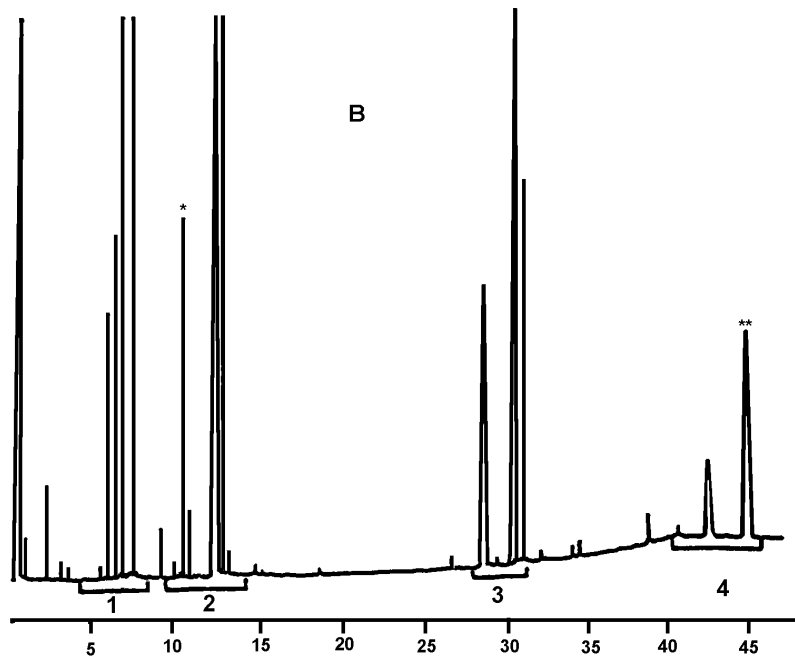
Légende:

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

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 triglycérides ne devrait pas excéder 15 %.



Légende:

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

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.»

7) À l'annexe X A, le point 6.2 est remplacé par le texte suivant:

«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.»
