

RÈGLEMENT (CE) N° 796/2002 DE LA COMMISSION

du 6 mai 2002

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'analyses y afférentes et les notes complémentaires figurant à l'annexe du règlement (CEE) n° 2658/87 du Conseil relatif à la nomenclature tarifaire et statistique et au tarif douanier commun

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu le règlement n° 136/66/CEE du Conseil du 22 septembre 1966 portant établissement d'une organisation commune de marché des matières grasses ⁽¹⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 1513/2001 ⁽²⁾, et notamment son article 35 bis,

vu le règlement (CEE) n° 2658/87 du Conseil du 23 juillet 1987 relatif à la nomenclature tarifaire et statistique et au tarif douanier commun ⁽³⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 578/2002 de la Commission ⁽⁴⁾, et notamment son article 9,

considérant ce qui suit:

(1) Le règlement (CEE) n° 2568/91 de la Commission ⁽⁵⁾ du 11 juillet 1991 relatif aux caractéristiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi qu'aux méthodes d'analyses y afférentes, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 2042/2001 ⁽⁶⁾, définit les caractéristiques physiques et chimiques ainsi que les caractéristiques organoleptiques des huiles d'olive et de grignons d'olive ainsi que les méthodes d'évaluation de ces caractéristiques. À partir du 1^{er} novembre 2001 la définition de la catégorie d'huile de grignons d'olive brute reprise au point 4 de l'annexe du règlement n° 136/66/CEE prévoit que certaines huiles d'olive obtenues à partir de grignons d'olive correspondent, à l'exception de certaines caractéristiques déterminées, aux huiles d'olive lampantes.

(2) Afin de distinguer les huiles obtenues par centrifugation des grignons d'olives et les huiles d'olive lampantes et en absence d'un paramètre analytique, il convient d'établir des valeurs limites relatives à la composition en cires, en érytrodiol et uvaol ou en alcools aliphatiques totaux pour différencier ces huiles, indépendamment de leurs méthodes d'obtention. Il convient à cet effet de définir une méthode pour déterminer la teneur en alcools aliphatiques totaux.

(3) Ces nouvelles limites rendent nécessaire la modification de la note complémentaire 2, du chapitre 15 de la nomenclature combinée figurant à l'annexe I du règlement (CEE) n° 2658/87; il convient de supprimer à cette occasion l'article 5 et l'annexe XIV du règlement (CEE) n°

2568/91 ainsi que certaines erreurs qui se sont glissées dans le texte du règlement (CEE) n° 2568/91.

(4) Afin d'harmoniser les procédures de préparation des esters méthyliques d'acides gras destinés à l'analyse de la composition en acides gras des huiles, l'évolution technique de méthodes d'analyse permet, en fonction de l'acidité libre des huiles, de réduire à deux le nombre des méthodes reprises à l'annexe X «B» actuellement en vigueur.

(5) Compte tenu de l'expérience acquise, une nouvelle méthode d'évaluation des caractéristiques organoleptiques des huiles d'olive vierges a été élaborée par le Conseil Oléicole International. Cette méthode s'avère plus fiable et plus simple que celle actuellement prévue à l'annexe XII du règlement (CEE) n° 2568/91. Il convient donc de remplacer la méthode prévue à l'annexe XII par la nouvelle méthode d'évaluation organoleptique des huiles d'olive vierges.

(6) Pour l'application de la nouvelle méthode d'évaluation organoleptique, il est nécessaire de prévoir une procédure d'arbitrage en cas de contradiction entre la catégorie déclarée et celle attribuée par le jury agréé réalisant l'évaluation.

(7) Afin de garantir les conditions pour la réalisation des analyses et compte tenu de la dispersion géographique de certaines régions, il est nécessaire de prévoir un délai différent pour l'envoi des échantillons au laboratoire après son prélèvement en tenant compte des conditions climatologiques de chaque saison. Pour la classification des huiles il convient de préciser que les résultats des analyses sont comparés avec les limites prévues par le règlement (CEE) n° 2568/91 qui tiennent déjà compte des marges de répétabilité et de reproductibilité des méthodes d'analyses employées.

(8) Pour permettre une période d'adaptation aux nouvelles normes et la mise en place des moyens nécessaires à leur application et pour ne pas causer de perturbation dans les transactions commerciales, il convient de reporter l'applicabilité des modifications prévues au présent règlement jusqu'au 1^{er} septembre 2002 ainsi que de prévoir une exception pour les huiles d'olive et de grignons d'olive conditionnées pour le commerce de détail avant cette date.

(9) Les mesures relevant de leurs compétences respectives prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité de gestion des matières grasses ainsi que du comité de code des douanes,

⁽¹⁾ JO L 172 du 30.9.1966, p. 3025/66.

⁽²⁾ JO L 201 du 26.7.2001, p. 4.

⁽³⁾ JO L 256 du 7.9.1987, p. 1.

⁽⁴⁾ JO L 97 du 13.4.2002, p. 1.

⁽⁵⁾ JO L 248 du 5.9.1991, p. 1.

⁽⁶⁾ JO L 276 du 19.10.2001, p. 8.

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

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

1) À l'article 2, paragraphe 1:

a) le troisième tiret est remplacé par le texte suivant:

«— pour la détermination de la teneur en cires, la méthode reprise à l'annexe IV.»

b) le tiret suivant est ajouté:

«— pour la détermination du contenu en alcools aliphatiques, la méthode reprise à l'annexe XIX.»

2) À l'article 2, le paragraphe 2 est remplacé par le texte suivant:

«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.»

3) À l'article 2, le paragraphe 3, deuxième alinéa, est remplacé par le texte suivant:

«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.»

4) À l'article 2, le paragraphe 5 suivant est ajouté:

«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.»

5) Les articles 3 et 3 bis sont supprimés.

6) L'article 3 ter devient l'article 3.

7) À l'article 4, le paragraphe 1 est remplacé par le texte suivant:

«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.
- 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.»

8) L'article 5 est supprimé.

9) Les annexes sont modifiées conformément à l'annexe du présent règlement.

Article 2

La note complémentaire 2 du chapitre 15 de la Nomenclature combinée figurant à l'annexe I du règlement (CEE) n° 2658/87 est modifiée comme suit:

1) Au point B I, la lettre a) est remplacée par le texte suivant:

«a) une teneur en cires non supérieure à 300 mg/kg;»

2) Au point B I, la lettre g) point 4) est remplacée par le texte suivant:

«4) des caractéristiques organoleptiques faisant apparaître une médiane des défauts supérieure à 6, conformément à l'annexe XII du règlement (CEE) n° 2568/91;»

3) Au point B II, la lettre g) est remplacée par le texte suivant:

«g) des caractéristiques organoleptiques faisant apparaître une médiane de défauts inférieure ou égale à 6, conformément à l'annexe XII du règlement (CEE) n° 2568/91;»

4) Au point D, la lettre b) est remplacée par le texte suivant:

«b) une teneur en érytrodiol et uvaol supérieure à 4,5;»

Article 3

Le présent règlement entre en vigueur le septième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

Pour les huiles d'olive et de grignons d'olive conditionnées pour le commerce de détail il est applicable à partir du 1^{er} septembre 2002.

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

Fait à Bruxelles, le 6 mai 2002.

Par la Commission
Franz FISCHLER
Membre de la Commission

ANNEXE

1. Au sommaire des annexes du règlement (CEE) n° 2568/91:
 - a) L'annexe XIV: Notes complémentaires 2, 3 et 4 du chapitre 15 de la Nomenclature Combinée est supprimée.
 - b) Le titre suivant est ajouté: «Annexe XIX: Méthode de détermination du contenu en alcools aliphatiques.»
2. L'annexe I est remplacée par les tableaux et le texte suivants:

CARACTÉRISTIQUES DES HUILES D'OLIVES

Catégorie	Acidité (%) (*)	Indice de peroxyde mEq O ₂ /kg (*)	Solvants halogénés mg/kg (*) (1)	Cires mg/kg (**)	Acides saturés en position 2 du triglycéride (%)	Stigmastadiène mg/kg (2)	Différence ECN42 HPLC et ECN42 Calcul théorique	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	K ₂₇₀ après alumine (3)	Delta-K (*)	Évaluation organoleptique Médiane du défaut (Md) (*)	Évaluation organoleptique Médiane du fruité (Mf) (*)
1. Huile d'olive vierge extra	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Huile d'olive vierge	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Huile d'olive vierge courante	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 6,0 (4)	—
4. Huile d'olive vierge lampante	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 300 (5)	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	—	Md > 6	—
5. Huile d'olive raffinée	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—	—
6. Huile d'olive	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—	—
7. Huile de grignons d'olive brute	> 0,5 (**)	—	—	> 350 (6)	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—	—
8. Huile de grignons d'olive raffinée	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—	—
9. Huile de grignons d'olive	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—	—

(1) Limite maximale pour les composés totaux halogénés détectés par détecteur à capture d'électrons.

Pour les composés détectés individuellement, la limite maximale est de 0,10 mg/kg.

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

(3) Aux fins de la vérification de la présence d'huile raffinée, lorsque le K₂₇₀ dépasse la limite de la catégorie concernée, il faut procéder à la détermination du K₂₇₀ après passage sur alumine.

(4) Lorsque la médiane du fruité est égale à 0, la médiane du défaut doit être inférieure ou égale à 2,5.

(5) 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.

(6) 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						Sommes des Isomères transoléiques (%)	Sommes des Isomères Translinoléiques + translinoléiques (%)	Cholestérol (%)	Brassicastérol (%)	Campestérol (%)	Stigmasterol (%)	Bétasitostérol (%) ⁽¹⁾	Delta-7-Stigmasterol (%)	Stérols totaux (mg/kg)	Erythrodiol et uvaol (%) (**)
	Myristique (%)	Linoléique (%)	Arachidique (%)	Eicosénoïque (%)	Béhénique (%)	Lignocérique (%)										
1. Huile d'olive vierge extra	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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	≤ 0,9	≤ 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 vierge courante	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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
4. Huile d'olive vierge lampante	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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 ⁽²⁾
5. Huile d'olive raffinée	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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 d'olive	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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
7. Huile de grignons d'olive brute	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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 ⁽³⁾
8. Huile de grignons d'olive raffinée	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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
9. Huile de grignons d'olive	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 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⁾ Somme de: Delta-5,23-Stigmastadiénol + Cholestérol + Beta-Sitostérol + Sitostanol + Delta-5-Avéna-stérol + Delta-5,24-Stigmastadiénol.

⁽²⁾ 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.

⁽³⁾ 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.
Le dernier chiffre doit être augmenté d'une unité si le chiffre suivant dépasse 4.
- b) 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.
- c) Les caractéristiques indiquées avec astérisque (*), se référant à la qualité de l'huile, impliquent que:
— pour l'huile d'olive vierge lampante, les limites y relatives (à l'exception du K₂₃₂) peuvent ne pas être simultanément respectées;
— pour les autres 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.
- d) Les caractéristiques indiquées avec deux astérisques (**) impliquent que, pour toutes les huiles de grignons d'olive concernées, les limites y relatives peuvent ne pas être simultanément respectées.»

3. L'annexe X «B» est remplacée par l'annexe suivante:

«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.

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'éluion 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'éluion 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. Décanner 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.

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).
- Phénolphtaléine, 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 phénolphtaléine. 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.

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.
- 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 × 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 ΔECN42, 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.

Palmitoléique (C16:1). Somme des aires des pics correspondant aux isomères ω9 et ω7 de l'ester méthylique.

Heptadécanoïque (C17:0).

Heptadécénoïque (C17:1).

Stéarique (C18:0).

Oléique (C18:1). Somme des aires des pics correspondant aux isomères ω9 et ω7 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).

Linoléique (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 mentionnées 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:

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

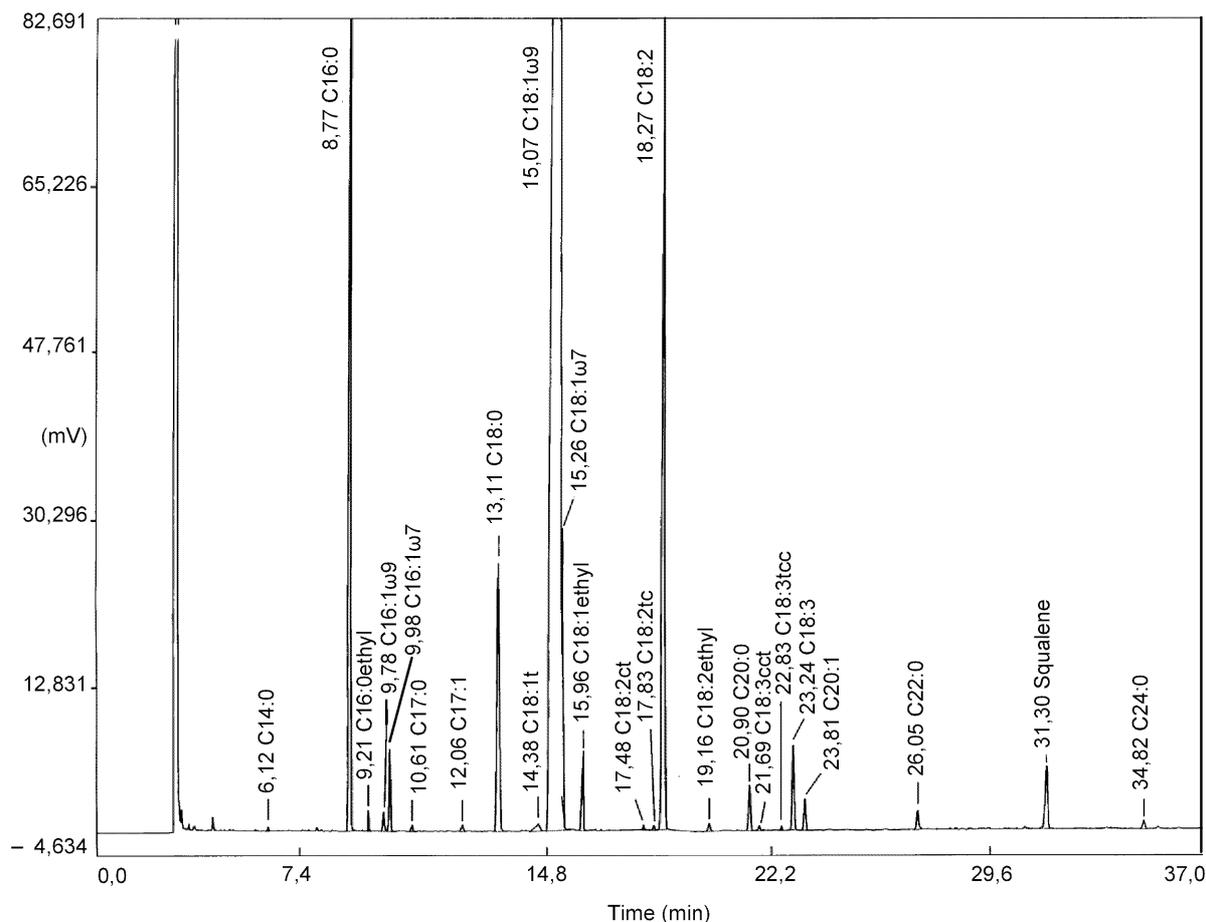


Figure 1: Profil chromatographique d'une huile de grignons d'olive, obtenu avec la méthode de méthylation à froid. Les pics chromatographiques correspondent aux esters méthyliques, sauf indication contraire.»

4. L'annexe XII est remplacée par l'annexe suivante:

«ANNEXE XII

ÉVALUATION ORGANOLEPTIQUE DES HUILES D'OLIVES VIERGES

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode a pour but d'établir les critères nécessaires à l'évaluation des caractéristiques organoleptiques des huiles d'olive vierges au sens du point 1 de l'annexe du règlement 136/66/CEE et de décrire la méthode pour leur classement à cet égard.

La méthode décrite n'est applicable que pour le classement des huiles d'olive vierges, en fonction de l'existence du fruité et de l'intensité des défauts, déterminés par un groupe de dégustateurs sélectionnés et entraînés, constitué en jury conformément au point 4.

2. GÉNÉRALITÉS

Pour le vocabulaire général de base, la salle de dégustation, la méthodologie générale ainsi que le verre de dégustation des huiles, il est recommandé de se conformer aux prescriptions prévues par le Conseil Oléicole International.

3. VOCABULAIRE SPÉCIFIQUE

3.1. Attributs positifs

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

Amer: goût caractéristique de l'huile obtenue d'olives vertes ou au stade de véraison.

Piquant: sensation tactile de picotement, caractéristique des huiles produites au début de la campagne, principalement à partir d'olives encore vertes.

3.2. **Attributs négatifs**

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

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.

Lies: flaveur caractéristique de l'huile restée en contact avec les "boues" de décantation dans les piles et les cuves.

Vineux-vinaigré: flaveur caractéristique de certaines huiles rappelant le vin ou le vinaigre. Elle est due fondamentalement à un processus de fermentation des olives qui donne lieu à la formation d'acides acétique, acétate d'éthyle et 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.

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 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.

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 neuf. 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.

4. JURY

Le jury est nommé par l'État membre et il est composé d'un chef de jury et de huit à douze dégustateurs. Toutefois, pour la campagne 2001/2002 le nombre des dégustateurs peut être moindre que huit.

Le chef du jury doit avoir reçu une formation solide, et être 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 habileté 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'huile d'olive vierge.

Les jurys doivent s'engager à participer à des évaluations organoleptiques prévues sur un plan national, communautaire ou international, pour le contrôle périodique et l'harmonisation des critères de perception. Par ailleurs, 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 sentir, puis déguster ⁽¹⁾ l'huile soumise à examen, contenue dans le verre à dégustation, afin d'en analyser les perceptions olfactives, gustatives, tactiles et kinesthésiques. Il doit ensuite porter sur la feuille de profil à sa disposition l'intensité à laquelle il perçoit chacun des attributs négatifs et positifs.

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 au point 3.2 de la présente méthode.

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 attribuées; 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. La saisie des données pour un échantillon est à réaliser à l'aide d'une matrice composée de 10 colonnes correspondant aux 10 attributs sensoriels et de n lignes correspondant aux n dégustateurs du jury.

Lorsqu'un attribut négatif est porté sous la rubrique "autres" par au moins 50 % du jury, le chef de jury doit procéder au calcul de la médiane de cet attribut et au classement correspondant.

Dans le cas des analyses effectuées dans le cadre de contrôles de conformité à la norme, ou de contre-expertises, le chef de jury doit faire procéder à l'évaluation organoleptique de l'huile en triplicata, à au moins une journée d'intervalle; la médiane des attributs sera calculée à partir de l'ensemble des données des feuilles de profil des trois essais.

5.3. Classement des huiles

L'huile est classée sous les dénominations ci-dessous, en fonction de la médiane des défauts et de la médiane de l'attribut fruité. Par médiane des défauts on entend la médiane de l'attribut négatif perçu avec l'intensité la plus forte. La valeur du coefficient de variation robuste pour cet attribut négatif doit être inférieure ou égale à 20 %.

- 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 2,5 et la médiane du fruité est supérieure à 0;
- c) *Huile d'olive vierge courante*: la médiane des défauts est supérieure à 2,5 et inférieure ou égale à 6,0; ou, la médiane des défauts est inférieure ou égale à 2,5 et la médiane du fruité est égale à 0;
- d) *Huile d'olive vierge lampante*: la médiane des défauts est supérieure à 6,0.

Toutefois, à partir du 1^{er} novembre 2003 les catégories c) et d) sont remplacées par la catégorie:

- c) *Huile d'olive lampante*: la médiane des défauts est supérieure à 2,5; ou la médiane des défauts est inférieure ou égale à 2,5 et la médiane du fruité est égale à 0.

5.4. Cas particulier

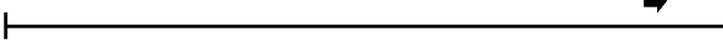
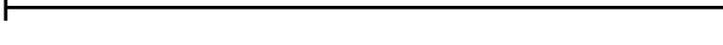
Lorsque la médiane d'un attribut positif autre que le fruité est supérieure à 5,0, le chef de jury le signalera sur le certificat d'analyse de l'huile.

⁽¹⁾ Il pourra s'abstenir de déguster quand il observera quelques attributs négatifs extrêmement intenses, et notera sur la feuille de profil cette circonstance exceptionnelle.

APPENDICE A

Feuille de profil

(à l'usage du dégustateur)

PERCEPTION DES DÉFAUTS	INTENSITÉ
Chômé	
Moisi-humide	
Vineux-vinaigre	
Lies	
Métallique	
Rance	
Autres (à préciser)	
PERCEPTIONS DES ATTRIBUTS POSITIFS	
Fruité	
Amer	
Piquant	

Nom du dégustateurCode de l'échantillondate

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 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 inférieur 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 50^e percentile d'une distribution de nombres ordonnés par ordre croissant. En d'autres termes, 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

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

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 de l'écart type asymptotique S dépend du N et IQR. N est le nombre d'observations et IQR l'intervalle interquartile, c'est-à-dire, l'estimation robuste de la variabilité des données considérées (l'intervalle interquartile renferme exactement 50 % des cas d'une distribution de probabilité quelconque). Le calcul de l'intervalle interquartile s'effectue en calculant la dimension de l'écart entre le 75^e et le 25^e 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.

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

Autrement dit, 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 25^e percentile représente la valeur de distribution correspondant à une aire égale à 0,25 ou 25/100.

Coefficient de variation % robuste

$$\text{CVR} = \frac{S}{Me} 100$$

Le CVR représente un nombre pur, c'est-à-dire sans dimension, qui indique le pourcentage de variabilité de la série de nombres analysée par rapport à la valeur Me de la médiane; pour cette raison, ce coefficient est très utile pour vérifier la fiabilité des membres du jury.

Intervalles de confiance à 95 % sur la médiane

Les intervalles de confiance (I.C.) à 95 % (valeur de l'erreur de première espèce égale à 0,05 ou 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, dans l'hypothèse où l'essai pourrait être répété plusieurs fois. L'intervalle aide à évaluer, comme dans le cas du CVR, la fiabilité de l'essai.

$$\text{I. C. Sup.} = Me + (c.S)$$

$$\text{I. C. Inf.} = Me - (c.S)$$

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

Le classement est effectué par comparaison des valeurs de la médiane avec les intervalles de référence déterminés au point 5.3 de la méthode. Le logiciel informatique permet un classement visualisé sur un tableau des données statistiques ou sur un graphique.»

5. L'annexe XIV est supprimée.
6. L'annexe XIX suivante est ajoutée:

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

3. APPAREILLAGE

- 3.1. Ballon de 250 millilitres muni d'un réfrigérant à reflux avec embouts rodés.
- 3.2. Ampoule à décanter de 500 millilitres.
- 3.3. Ballons de 250 millilitres.
- 3.4. Équipement complet pour chromatographie en phase solide, avec plaques de verre de 20 × 20, centimètres.
- 3.5. Lampe à lumière ultraviolette, de longueur d'onde de 366 ou 254 nm.
- 3.6. Microseringues de 100 et 500 microlitres.
- 3.7. Ampoule cylindrique filtrante à filtre poreux G 3 (porosité 15 à 40 micromètres) de 2 centimètres de diamètre environ et de 5 centimètres de hauteur, avec embout approprié pour filtration sous vide et embout rodé mâle 12/21.
- 3.8. Fiole à vide de 50 millilitres avec embout rodé femelle 12/21 adaptable à l'ampoule filtrante (3.7).
- 3.9. Tube à fond conique, de 10 millilitres, avec bouchon hermétique.
- 3.10. Chromatographe en phase gazeuse approprié au fonctionnement avec colonne capillaire, équipé d'un système de fractionnement, constitué de:
 - 3.10.1. Enceinte thermostatée pour la colonne, permettant de maintenir la température désirée avec une précision d'environ 1 °C.
 - 3.10.2. Ensemble 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).

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. Hexaméthylsilazane.
- 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 corresponde à environ 10 % du contenu en alcools aliphatiques dans l'aliquote de l'échantillon à prélever pour la détermination. Par exemple, pour 5 grammes d'échantillon, il faut ajouter 250 microlitres de la solution d'1-eicosanol à 0,1 % s'il s'agit d'un échantillon d'huile d'olive 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.

- 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 étherés 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 (*).

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.

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

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

- 5.2.4. Mettre la plaque dans la cuve de développement, préparée comme décrit au point 5.2.2. La température ambiante doit être maintenue entre 15 et 20 °C. Fermer aussitôt la 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-hexaméthylsilazane-triméthylchlorosilane 9/3/1 (V/V/V) (note 5) dans une proportion de 50 microlitres par milligramme d'alcools aliphatiques, en évitant toute absorption d'humidité (note 6).

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

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.

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

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,
- 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 microseringue 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 seringue de façon à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille au travers de la membrane du complexe d'injection et, après 1 à 2 secondes, injecter rapidement et extraire ensuite l'aiguille lentement, après 5 secondes environ.

5.4.3.2. Procéder à l'enregistrement jusqu'à élution complète des TMSE des alcools aliphatiques présents. La ligne de base doit toujours correspondre aux conditions requises (5.4.1.2):

5.4.4. Identification des pics

L'identification des pics 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-icosanol 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-icosanol

m_s = poids d'1-icosanol 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".

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.

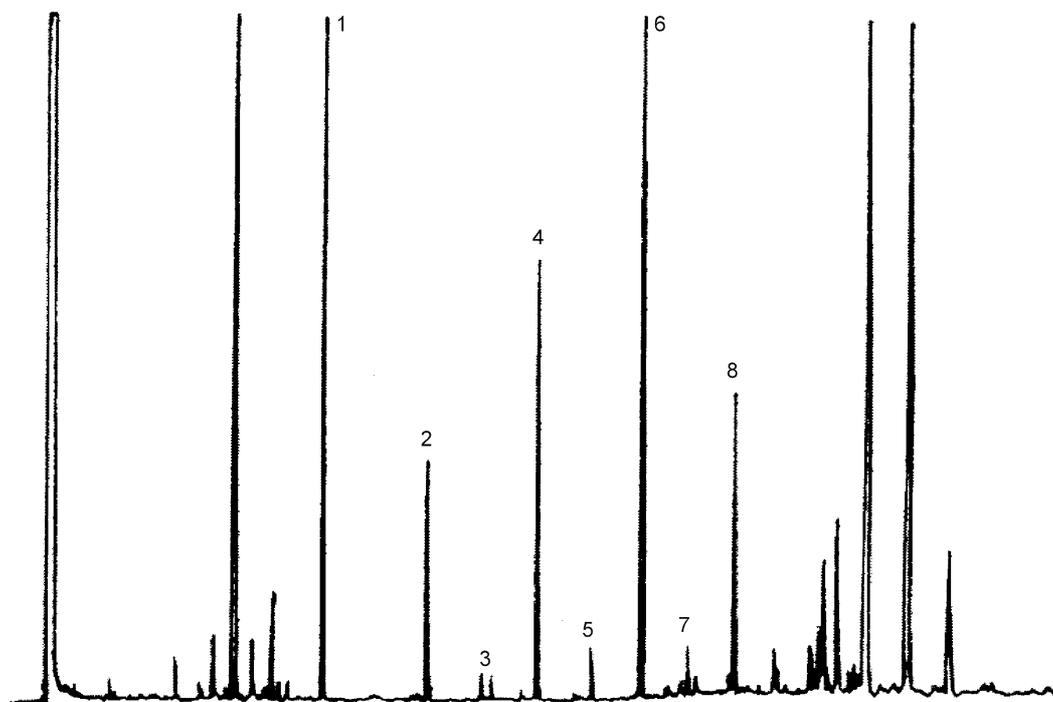


Figure 1 — Chromatogramme de la fraction alcoolique d'une huile vierge

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