



MÉTHODE D'ANALYSE
DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN CIRES ET EN ESTERS
ÉTHYLIQUES DES ACIDES GRAS PAR CHROMATOGRAPHIE EN
PHASE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE

MÉTHODE A (15 g de silice)

1. OBJET

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

Ce document présente deux méthodes qui peuvent être utilisées pour le contrôle officiel. La méthode A (15 g de silice) est la méthode de référence pour la contre-expertise.

2. PRINCIPE

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

3. APPAREILLAGE

3.1. Tube à essai, 10 ml.

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

3.3. Chromatographe en phase gazeuse pouvant être utilisé avec une colonne capillaire, équipé d'un système d'injection directe dans la colonne comprenant :

3.3.1. Four thermostaté équipé d'un programmeur de température.

- 3.3.2. **Injecteur à froid** pour l'injection directe dans la colonne
- 3.3.3. **Détecteur d'ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur.**
- 3.3.4. **Enregistreur-intégrateur** (*Note 1*) à utiliser avec le convertisseur-amplificateur (3.3.3), avec un temps de réponse non supérieur à 1 s et une vitesse variable de déroulement du papier.
- 3.3.5. **Colonne capillaire en silice fondue (pour l'analyse des cires et des esters méthyliques et éthyliques)**, longueur 8-12 m, diamètre intérieur 0,25-0,32 mm, recouverte à l'intérieur de liquide de répartition (*Note 2*) à l'épaisseur uniforme comprise entre 0,10 et 0,25 µm.
- 3.4. **Microseringue** de 10 µl, équipée d'une aiguille cémentée, pour introduction directe dans la colonne.
- 3.5. **Agitateur électrique.**
- 3.6. **Évaporateur rotatif.**
- 3.7. **Four à moufle.**
- 3.8. **Balance analytique** garantissant une précision de la mesure de ± 0,1 mg.
- 3.9. **Verrerie de laboratoire habituelle.**

4. **RÉACTIFS**

- 4.1. **Gel de silice**, d'une granulométrie comprise entre 60 et 200 µm mesh. Placer le gel de silice dans le four à moufle à 500 °C pendant au moins 4 heures. Laisser refroidir puis ajouter 2% d'eau par rapport à la quantité de gel de silice utilisée. Bien agiter pour homogénéiser la suspension et la conserver dans le dessiccateur pendant au moins 12 heures avant de l'utiliser. Si le gel de silice est de haute pureté, le traitement au four à moufle ne sera pas nécessaire.
- 4.2. **n-Hexane**, pour chromatographie (ou analyse de résidus) - la pureté doit être vérifiée comme suit :
Procéder à la dessiccation de 100 ml de n-hexane par évaporation et redissoudre le résidu dans 100 µl de n-heptane. Analyser dans les mêmes conditions de chromatographie en phase gazeuse. Il ne doit pas y avoir de pic dans la zone d'éluion des alkyl esters (l'hexane peut être remplacé par l'isooctane).
Hexane - Chromosolv Pestanal est disponible chez Honeywell-Riedel-de Haen (code 34484).

Note 1. Il est également possible d'utiliser des systèmes informatisés qui permettent la saisie des données de chromatographie en phase gazeuse sur PC.

Note 2. Liquides de répartition adaptés à l'emploi, du type SE52 ou SE 54 (méthylsilicone avec 5% de phényle), etc., ou toute autre phase de polarité similaire ou inférieure, disponibles dans le commerce.

Cette référence est un exemple de produits appropriés, qui sont disponibles dans le commerce. Ces informations sont données pour la commodité des utilisateurs de cette norme et ne constituent pas une approbation de ces produits.

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

4.3. Éther éthylique, pour chromatographie.

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

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

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

4.5. **Solution étalon d'arachidate laurique** (*Note 3*) à 0,02% (m/V) dans l'heptane (étalon interne pour cires).

4.6. **Solution étalon d'heptadécanoate méthylique** à 0,005% (m/V) dans l'heptane (étalon interne pour esters méthyliques et éthyliques).

4.7. **Sudan 1 (1-phényl-azo-2-naphthol)** facultatif (attention : les composés azoïques ont des propriétés mutagènes et cancérogènes).

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

AVERTISSEMENT :

Hydrogène. Extrêmement inflammable, sous pression. Tenir à l'écart de sources de chaleur, étincelles ou flammes nues ou d'appareils électriques non antidéflagrants. S'assurer que la soupape de la bouteille est bien fermée lorsqu'elle n'est pas utilisée. Utiliser exclusivement avec un réducteur de pression. Desserrer le ressort du réducteur avant l'ouverture de la soupape de la bouteille. S'éloigner du point de sortie du gaz de la bouteille au moment de l'ouverture de la soupape. Utiliser dans un local bien aéré. Ne pas transférer

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

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

4.9 Gaz auxiliaires

- Hydrogène, pur, de qualité pour chromatographie en phase gazeuse.
- Air, pur, de qualité pour chromatographie en phase gazeuse.

AVERTISSEMENT

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

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. Préparation de la colonne chromatographique

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, utiliser un agitateur électrique (3.5) pour rendre la couche chromatographique plus homogène. Percoler 20 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 le tube à essai de 10 ml (3.1). Ajouter la quantité appropriée d'étalon interne (4.5), en fonction du contenu présumé de cires. Par exemple, ajouter 0,10 mg d'arachidate laurique dans le cas de l'huile d'olive vierge extra, vierge, raffinée et de l'huile d'olive ; 0,25 à 0,50 mg dans le cas de l'huile de grignons et 0,05 mg de heptadécanoate méthylique dans le cas des huiles d'olive vierges extra (4.6).

Introduire l'échantillon ainsi préparé dans la colonne chromatographique à l'aide de deux fractions 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 et percoler 50 ml de n-hexane/éther éthylique (99:1) pour éliminer les hydrocarbures (alcanes et styrènes) de n-hexane/éther éthylique (99:1) (*Note 4*) et prélever 150 ml à un débit d'environ 15 gouttes toutes les 10 secondes.

Cette fraction contient les esters éthyliques et les cires (*Note 5*).

La fraction ainsi obtenue est séchée dans l'évaporateur rotatif (3.6) jusqu'à élimination pratiquement totale du solvant. Les 2 derniers ml du solvant sont éliminés à l'aide d'un faible courant d'azote. Prélever la fraction contenant les esters méthyliques et éthyliques est diluée avec 2 à 4 ml de n-heptane ou de iso-octane.

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 connecté 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, fonctionnement 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'appareil de chromatographie en phase gazeuse. Chauffer graduellement jusqu'à atteindre, au bout d'environ 4 heures, une température de 350 °C.

Maintenir cette température pendant au moins 2 heures, puis 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 deux 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.

Note 4. Le mélange n-hexane/éther éthylique (99 :1) doit être préparé chaque jour. Le n-hexane peut être remplacé par la même quantité d'isooctane.

Note 5. Pour contrôler visuellement l'élution correcte des cires, il est possible d'ajouter à l'échantillon en solution 100µl de Sudan à 1% dans le mélange d'élution. Le colorant ayant une rétention intermédiaire entre les cires et les triglycérides, il convient de suspendre l'élution lorsque la coloration atteint le fond de la colonne chromatographique, car toutes les cires ont été éluées. Vérifier l'élution correcte en contrôlant la présence sur le chromatogramme au même moment du squalène et de l'époxy squalène.

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 pour les cires et les esters éthyliques (Note 6)

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

- Température de la colonne :

20 °C/min 5 °C/min

80 °C au début (1') → 140 °C → 335 °C (20') pour les esters éthyliques et les cires

20 °C/min 5 °C/min 20 °C/min

80 °C au départ (1') → 240 °C → 325 °C (6') → 340 °C (10') pour les cires
uniquement

- Température du détecteur : 350 °C.
- Quantité injectée : 1 µl de solution de n-heptane (1-2ml).
- Gaz vecteur : hélium ou hydrogène à la vitesse linéaire optimale pour le gaz choisi (voir annexe A).
- Sensibilité instrumentale : appropriée pour remplir les conditions ci-dessus.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et du chromatographe en phase gazeuse afin de séparer toutes les cires et les esters éthyliques d'acides gras et d'obtenir une séparation satisfaisante des pics (voir figures 1-2) et un temps de rétention de 18 ± 3 minutes pour l'étalon interne d'arachidate de lauryle. Le pic le plus représentatif des cires doit être supérieur à 60% de la valeur de pleine échelle dans le cas de l'huile d'olive raffinée, de l'huile d'olive, des huiles de grignons d'olive, tandis qu'il doit être compris entre 60% et la pleine échelle dans le cas de l'huile d'olive vierge extra et de l'huile d'olive vierge. L'étalon interne heptadécanoate de méthyle pour les esters éthyliques doit s'adapter à la valeur pleine échelle.

- Gaz vecteur : hélium ou hydrogène à la vitesse linéaire optimale pour le gaz choisi (voir annexe A).
- Sensibilité instrumentale : appropriée pour remplir les conditions ci-dessus.

5.3. Exécution de l'analyse

Prélever 1-2 µl de la solution à l'aide de la microsiringue de 10 µl. Retirer le piston de la siringue jusqu'à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille dans le dispositif d'injection

Note 6. Vu la température finale élevée, on admet une dérive positive qui ne doit pas être supérieure à 10 % du fond de l'échelle.

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 (C40-C46), selon la fraction analysée.

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. Les alkyl esters sont identifiés à partir de mélanges d'esters méthyliques et éthyliques des principaux acides gras de l'huile d'olive (palmitique et oléique).

La figure 1 représente un chromatogramme des EEAG et des cires dans une huile d'olive vierge extra au moyen de la méthode A (15 g).

La figure 2 représente un chromatogramme des EEAG et des cires dans une huile d'olive lampante au moyen de la méthode A (15 g).

5.5. Évaluation quantitative des cires

Procéder au calcul des aires des pics de l'étalon interne arachidate laurique et des esters aliphatiques de C42 à C46 dans le cas de l'huile d'olive vierge extra et de l'huile d'olive vierge et C40 à C46 dans le cas d'autres huiles, à l'aide de l'intégrateur.

Calculer la teneur en cires de chaque cire individuelle, en mg/kg de matière grasse, au moyen de la formule suivante :

$$Waxes, mg/kg = \frac{A_x * m_s * 1000}{A_s * m}$$

où :

A_x = aire du pic de l'ester individuel, en millimètres carrés (pics 11-13, 14-15, 16-17-18 dans la figure 2).

A_s = aire du pic de l'étalon interne d'arachidate laurique, en millimètres carrés

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

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

5.6. Évaluation quantitative des esters éthyliques

Procéder au calcul des aires des pics de l'étalon interne heptadécanoate méthylique des esters éthyliques des acides gras C16 et C18 à l'aide de l'intégrateur.

Déterminer la teneur en ester éthylique, en mg/kg de matière grasse, comme suit :

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

où :

A_x = aire du pic de chaque ester éthylique en C16 et C18, en millimètres carrés.

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

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

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

6. **EXPRESSION DES RÉSULTATS**

Indiquer la somme des teneurs des différentes cires de C42 à C46 dans le cas de l'huile d'olive vierge extra et des huiles d'olive vierges et de C40 à C46 dans le cas d'autres huiles (*Note 7*) en milligrammes par kilogrammes de matière grasse (ppm).

Indiquer la somme des teneurs des esters éthyliques de C16 à C18 et le total des deux.

Les résultats doivent être exprimés au mg/kg près.

Note 7. 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 jointe.

MÉTHODE B (3 g DE SILICE)

1. OBJET

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

2. PRINCIPE

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

3. APPAREILLAGE

- 3.1. Tube à essai, 10 ml.**
- 3.2. Colonne en verre pour chromatographie liquide, diamètre intérieur 10 mm, hauteur 40 cm, équipée d'un robinet.**
- 3.3. Appareil de chromatographie en phase gazeuse approprié pour le fonctionnement avec colonne capillaire, équipé d'un système d'introduction directe dans la colonne, constitué des éléments suivants :**
 - 3.3.1. Four à thermostat équipé d'un programmeur de température.**
 - 3.3.2. Injecteur à froid** pour introduction directe dans la colonne.
 - 3.3.3. Révélateur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur.**
 - 3.3.4. Enregistreur-intégrateur (Note 1)** approprié pour fonctionner avec le convertisseur-amplificateur (3.3.3), vitesse de réponse non supérieure à 1 seconde et vitesse variable de déroulement du papier.

Note 1. Il est également possible d'utiliser des systèmes informatisés qui permettent la saisie des données de chromatographie en phase gazeuse sur PC.

- 3.3.5. Colonne capillaire en silice fondue** (pour l'analyse des cires et des esters méthyliques et éthyliques), longueur 8-12 m, diamètre intérieur 0,25-0,32 mm, recouverte à l'intérieur de liquide de répartition (*Note 2*) à l'épaisseur uniforme comprise entre 0,10 et 0,25 µm.
- 3.4. Microseringue** de 10 µl, équipée d'une aiguille cémentée, pour introduction directe dans la colonne.
- 3.5. Agitateur électrique.**
- 3.6. Évaporateur rotatif.**
- 3.7. Four à moufle.**
- 3.8. Balance analytique** garantissant une précision de la mesure de ± 0,1 mg.
- 3.9. Verrerie de laboratoire habituelle.**

4. RÉACTIFS

4.1. Gel de silice, d'une granulométrie comprise entre 60 et 200 µm mesh. Le gel de silice doit être placé dans le four à 500°C pendant au moins 4 h. Après refroidissement, y ajouter 2% d'eau par rapport à la quantité de gel de silice utilisée. Agiter convenablement afin d'homogénéiser la masse. Conserver à l'obscurité pendant au moins 12 heures avant emploi. Si le gel de silice est de haute pureté, le traitement au four à moufle ne sera pas nécessaire.

4.2. n-Hexane, pour chromatographie ou analyse de résidus. La pureté doit être contrôlée comme suit :

Procéder à la dessiccation de 100 ml de n-hexane par évaporation et redissoudre le résidu dans 100 µl de n-heptane. Analyser dans les mêmes conditions de chromatographie en phase gazeuse. Il ne doit pas y avoir de pic dans la zone d'élution des alkyl esters (l'hexane peut être remplacé par l'isooctane).

Hexane - Chromosolv Pestanal est disponible chez Honeywell-Riedel-de Haen (code 34484).

Cette référence est un exemple de produits appropriés, qui sont disponibles dans le commerce. Ces informations sont données pour la commodité des utilisateurs de cette norme et ne constituent pas une approbation de ces produits.

AVERTISSEMENT - Risques d'inflammation des vapeurs. Tenir à l'écart de sources de chaleur, étincelles ou flammes nues. Bien fermer les récipients et utiliser dans un local bien aéré. Éviter l'accumulation de vapeurs et éliminer toute cause possible d'incendie, telle que radiateurs et appareils

Note 2. Liquides de répartition adaptés à l'emploi, du type SE52 ou SE 54 (méthylsilicone avec 5% de phényle), etc., ou toute autre phase de polarité similaire ou inférieure, disponibles dans le commerce.

électriques non antidéflagrants. Nocif par inhalation : peut nuire aux cellules du système nerveux. Éviter de respirer les vapeurs. Utiliser si nécessaire un appareil respiratoire adéquat. Éviter tout contact avec les yeux et la peau.

4.3. Éther éthylique, pour chromatographie.

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

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

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

4.5. Solution étalon d'arachidate laurique (*Note 3*) à 0,01% (m/V) dans l'heptane (étalon interne pour cires).

4.6. Solution étalon d'heptadécanoate méthylique à 0,002% (m/V) dans l'heptane (étalon interne pour esters méthyliques et éthyliques).

4.7. Sudan 1 (1-phényl-azo-2-naphthol)

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

AVERTISSEMENT :

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

Hélium. Comprimé sous haute pression. Réduit l'oxygène disponible pour la respiration. Conserver le conteneur fermé. Utiliser dans un local bien aéré. Ne pas entrer dans les locaux de stockage s'ils ne sont pas bien ventilés. Utiliser exclusivement avec un réducteur de pression. Desserrer le ressort du réducteur avant l'ouverture de la soupape de la bouteille. Ne pas transférer le gaz d'une bouteille à une autre. S'assurer

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

que les bouteilles ne risquent pas de tomber. S'éloigner du point de sortie du gaz de la bouteille au moment de l'ouverture de la soupape. Éloigner les bouteilles des rayons du soleil ou de toute autre source de chaleur. Ne pas stocker dans des espaces corrosifs. Ne pas utiliser de bouteilles abîmées ou sans étiquette. Ne pas inhaler. Utiliser exclusivement à des fins techniques.

4.9. Gaz auxiliaires

- Hydrogène, pur, de qualité pour chromatographie en phase gazeuse.
- Air, pur, de qualité pour chromatographie en phase gazeuse.

AVERTISSEMENT

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

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. Préparation de la colonne de chromatographie

Suspendre 3 g de gel de silice (4.1) dans le n-hexane (4.2) et l'introduire dans la colonne (3.2). Après tassement spontané, utiliser un agitateur électrique (3.5) pour rendre la couche chromatographique plus homogène. Percoler 10 ml de n-hexane afin d'éliminer les impuretés éventuelles. Peser exactement à l'aide de la balance (3.8) 100 mg de l'échantillon dans le tube à essai de 10 ml (3.1). Ajouter la quantité appropriée d'étalon interne (4.5), en fonction du contenu présumé de cires. Par exemple, ajouter 0,01 mg d'arachidate laurique dans le cas de l'huile d'olive vierge extra, de l'huile d'olive vierge et de l'huile d'olive raffinée et de l'huile d'olive, et 0,025 à 0,10 mg dans le cas de l'huile de grignons et 0,002 mg de heptadécanoate méthylique dans le cas de l'huile d'olive vierge extra et de l'huile d'olive (4.6). Introduire l'échantillon ainsi préparé dans la colonne chromatographique à l'aide de deux fractions 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 et percoler 12-15 ml de n-hexane pour éliminer les hydrocarbures (alcane et stérènes) de n-hexane/éther éthylique (99:1) (*Note 4*) et recueillir 40-45 ml à un débit d'environ 15 gouttes toutes les 10 secondes.

Cette fraction contient les esters éthyliques et les cires (*Note 5*).

La fraction ainsi obtenue est séchée dans l'évaporateur rotatif (3.6) jusqu'à élimination pratiquement totale du solvant. Les 2 derniers ml du solvant sont éliminés à l'aide d'un faible courant d'azote. Prélever la fraction contenant les esters méthyliques et éthyliques diluée avec 0,5-1 ml de n-heptane ou de iso-octane.

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 connecté 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, fonctionnement 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'appareil de chromatographie en phase gazeuse. Chauffer graduellement jusqu'à atteindre, au bout d'environ 4 heures, une température de 350 °C.

Maintenir cette température pendant au moins 2 heures, puis 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.

Note 4. Le mélange n-hexane/éther éthylique (99:1) doit être fraîchement préparé chaque jour, le n-hexane peut être remplacé par la même quantité d'iso octane.

Note 5. Pour contrôler visuellement l'élution correcte des cires, il est possible d'ajouter à l'échantillon en solution 100µl de Sudan à 1% dans le mélange d'élution. Le colorant ayant une rétention intermédiaire entre les cires et les triglycérides, il convient de suspendre l'élution lorsque la coloration atteint le fond de la colonne chromatographique, car toutes les cires ont été éluées. Vérifier l'élution correcte en contrôlant la présence sur le chromatogramme au même moment du squalène et de l'époxy squalène.

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

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

- Température de la colonne :

20 °C/min 5 °C/min
80 °C au départ (1') → 140 °C → 335 °C (20') pour les esters éthyliques et les cires

20 °C/min 5 °C/min
80 °C au début (1') → 200 °C → 335 °C (20') pour les cires uniquement

- Température du révélateur : 350 °C.
- Quantité injectée : 1 µl de solution de n-heptane (0.5-1ml).
- Gaz vecteur : hélium ou hydrogène à la vitesse linéaire optimale pour le gaz choisi (voir annexe A).
- Sensibilité instrumentale : appropriée pour remplir les conditions ci-dessus.

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 et des esters éthyliques des acides gras, une résolution satisfaisante des pics (voir figures 1 et 2) et un temps de rétention de l'étalon interne arachidate laurique de 18 + 3 minutes. Le pic des cires le plus représentatif doit être supérieur à 60% du fond de l'échelle dans les cas de l'huile d'olive raffinée, de l'huile d'olive, des huiles de grignons d'olive et entre 60% du fond de l'échelle et la totalité dans le cas de l'huile d'olive vierge extra et de l'huile d'olive vierge. L'étalon interne heptadécanoate méthylique des esters éthyliques doit atteindre la totalité du fond de l'échelle.

- Gaz vecteur : hélium ou hydrogène à la vitesse linéaire optimale pour le gaz choisi (voir annexe A).
- Sensibilité instrumentale : appropriée pour remplir les conditions ci-dessus.

Note 6. 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 1-2 µl de la solution à l'aide de la microsiringue de 10 µl ; retirer le piston de la siringue jusqu'à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille dans le dispositif d'injection et après 1-2 secondes, injecter rapidement. Au bout d'environ 5 secondes, extraire lentement l'aiguille.

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

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. Les alkyl esters sont identifiés à partir de mélanges d'esters méthyliques et éthyliques des principaux acides gras de l'huile d'olive (palmitique et oléique).

L'annexe A donné quelques exemples de chromatogrammes d'esters éthyliques et de cires convenant pour identifier les pics connexes.

La figure 3 représente un chromatogramme des EEAG et des cires dans une huile d'olive vierge extra au moyen de la méthode B (3 g).

La figure 4 représente les chromatogrammes des EEAG et des cires dans une huile d'olive vierge au moyen de la méthode B (3 g).

5.5. Évaluation quantitative des cires

Procéder au calcul des aires des pics de l'étalon interne arachidate laurique et des esters aliphatiques de C42 à C46 dans le cas de l'huile d'olive vierge et de l'huile d'olive vierge et de C40 à C46 pour les autres huiles à l'aide de l'intégrateur.

Calculer la teneur de chaque cire, en mg/kg de matière grasse, comme suit :

$$Waxes, mg/kg = \frac{A_x * m_s * 1000}{A_s * m}$$

où :

A_x = aire du pic des esters individuels, en millimètres carrés (pic n° 11-13, 14-15, 16-17-18 dans la figure 2).

A_s = aire du pic de l'étalon interne d'arachidate laurique, en millimètres carrés.

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

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

5.6. Évaluation quantitative des esters éthyliques

Procéder au calcul des aires des pics de l'étalon interne heptadécanoate méthylique et des esters éthyliques des acides gras C16 et C18 à l'aide de l'intégrateur.

Calculer la teneur des alkyl esters, en mg/kg de matière grasse, comme suit :

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

où :

A_x = aire du pic de chaque ester éthylique en C16 et C18, en millimètres carrés.

A_s = aire du pic de l'étalon interne heptadécanoate méthylique, en millimètres carrés.

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

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

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Indiquer la somme des teneurs des différentes cires de C42 à C46, en mg/kg de matière grasse (ppm) dans le cas de l'huile d'olive vierge extra et de l'huile d'olive vierge et de C40 à C46 pour les autres huiles (*Note 7*) en milligrammes par kilogramme de matière grasse.

Indiquer la somme des teneurs des esters éthyliques de C16 à C18 et le total des deux.

Les résultats sont exprimés avec une décimale.

Les résultats doivent être exprimés au mg/kg près.

Note 7 . 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

ANNEXE A

Exemples de chromatogrammes

Les chromatogrammes suivants sont rapportés à titre d'aide pour identifier les pics ainsi que pour donner des informations sur la séparation à obtenir.

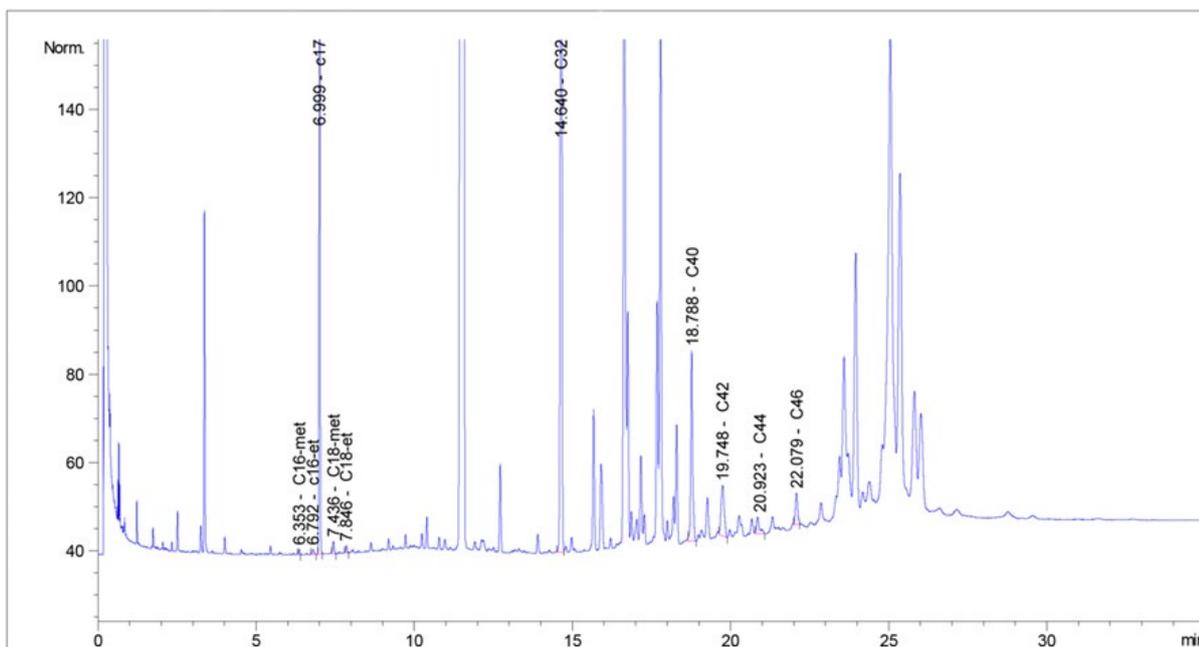


Figure 1 : Chromatogramme des EEAG et des cires d'HOVE selon la méthode A (15 g).

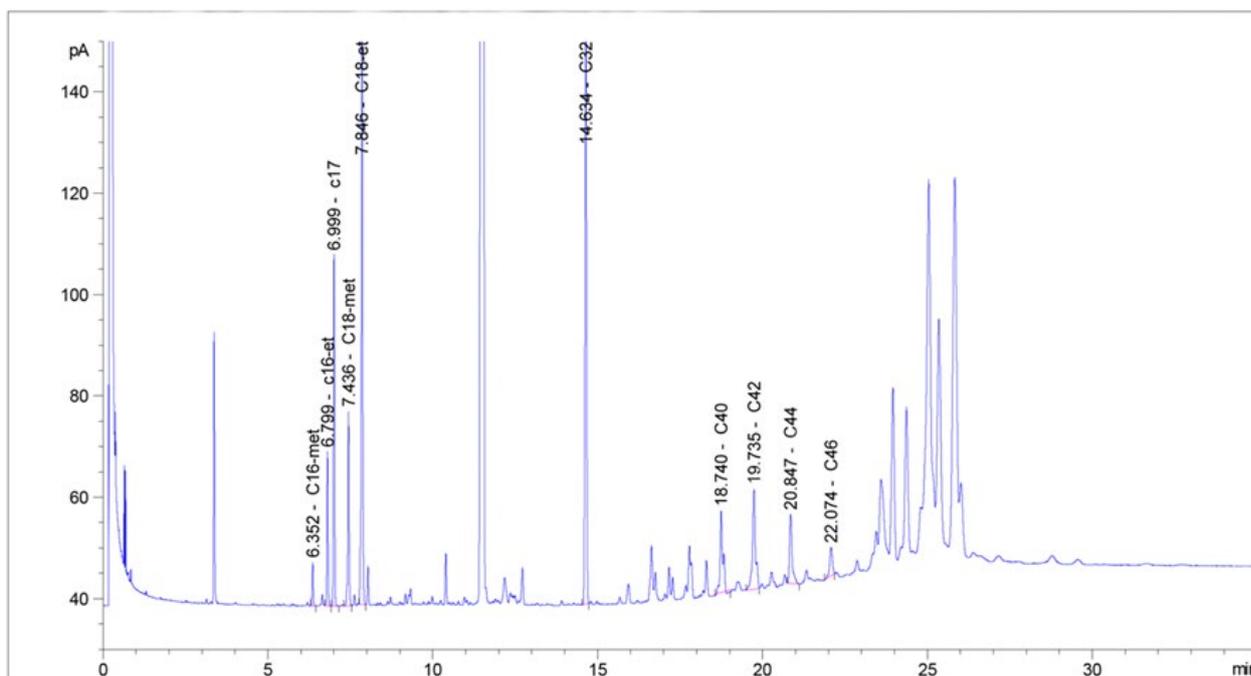


Figure 2 : Chromatogramme des EEAG et des cires de l'huile d'olive lampante selon la méthode A (15 g).

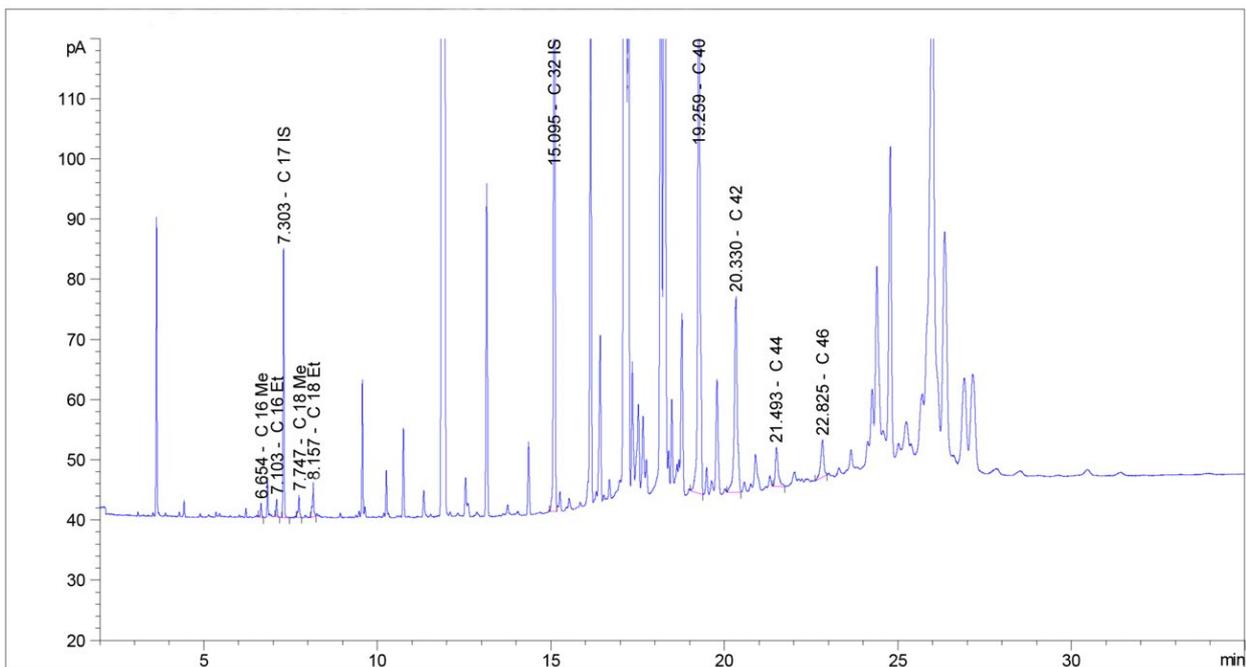


Figure 3 : Chromatogramme des EEAG et des cires d'HOVE selon la méthode B (3 g).

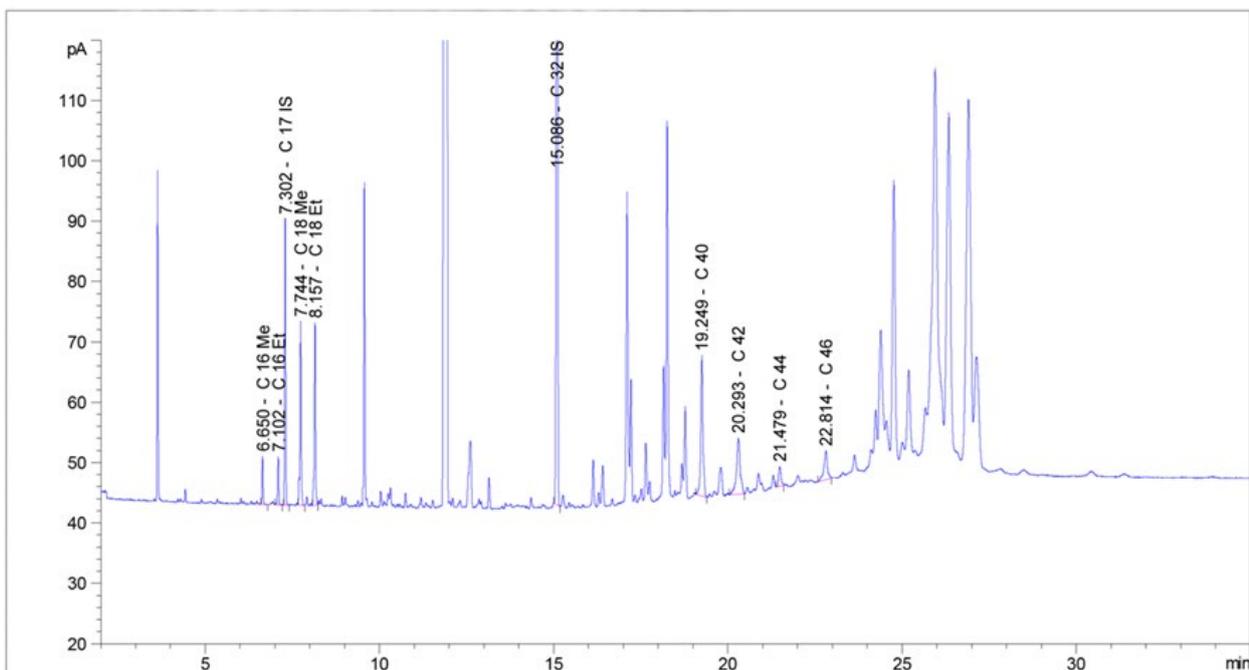


Figure 4 : Chromatogramme des EEAG et des cires de HOV selon la méthode B (3 g).

ANNEXE B

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 réglage aux conditions opératoires normales. Chronométrer le temps employé par le gaz pour parcourir la colonne, de l'injection jusqu'à la sortie du pic (tM).

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 tM le temps chronométré en secondes.

ANNEXE C

Marges de précision de la méthode des esters éthyliques et des cires

Analyse des résultats des essais collaboratifs

Les résultats de l'essai collaboratif organisé par le Secrétariat exécutif du COI ont été traités statistiquement selon les règles définies dans les normes internationales ISO 5725.

Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Les valeurs aberrantes ont été examinées en appliquant le test de Cochran et de Grubbs aux résultats des laboratoires pour chaque détermination (répliques a et b).

Les valeurs de précision de la méthode sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Le tableau fait état des informations suivantes :

n	nombre de laboratoires participants
valeurs aberrantes (outliers)	nombre de laboratoires présentant des valeurs aberrantes
moyenne	moyenne des résultats acceptés
<i>r</i>	<i>Valeur au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai, obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps</i>
<i>S_r</i>	<i>Écart-type de répétabilité</i>
<i>RSD_r (%)</i>	<i>Coefficient de variation de répétabilité ($S_r \times 100 / \text{mean}$)</i>
<i>R</i>	<i>Valeur au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.</i>
<i>S_R</i>	<i>Écart-type de reproductibilité</i>
<i>RSD_R (%)</i>	<i>Coefficient de variation de reproductibilité ($S_R \times 100 / \text{mean}$)</i>

Esters éthyliques (mg/kg) - Méthode A 15 g de silice				
Échantillon	M1	M2	M3	M4
Moyenne	10	8,21	36,97	50,83
n	16	16	16	16
outliers	3	2	0	0
Sr	0,574	0,330	1,316	1,934
RSDr (%)	5,74	4,02	3,56	3,80
r	1,61	0,92	3,68	5,41
S_R	0,759	0,915	3,720	6,736
RSD_R (%)	7,59	11,15	10,06	13,25
R	2,12	2,56	10,42	18,86

Cires (mg/kg) Méthode A 15 g de silice					
Échantillon	M1	M2	M3	M4	M5
Moyenne	93,00	45,17	38,54	323,17	2350,72
n	16	16	16	16	16
outliers	4	1	2	1	0
Sr	0,610	1,406	1,315	4,346	35,728
RSDr (%)	0,66	3,11	3,41	1,34	1,52
r	1,71	3,94	3,68	12,17	100,04
S_R	8,053	4,879	5,590	23,649	247,180
RSD_R (%)	8,66	10,80	14,51	7,32	10,52
R	22,55	13,66	15,65	66,22	692,10

Esters éthyliques (mg/kg) -Méthode B (3 g de silice)				
Échantillon	M1	M2	M3	M4
Moyenne	10,00	8,15	39,22	52,46
n	15	15	15	15
Outliers	4	4	0	0
S_r	0,570	0,225	1,234	1,903
RSDr (%)	5,90	2,76	3,15	3,63
r	1,65	0,63	3,46	5,33
S_R	1,681	0,991	4,450	4,691
RSD_R (%)	14,00	12,16	11,34	8,94
R	3,92	2,77	12,46	13,13

Cires (mg/kg) Méthode B (3 g de silice)					
Échantillon	M1	M2	M3	M4	M5
Moyenne	90,45	45,53	38,81	325,47	2354,21
n	15	15	15	15	15
Outliers	2	1	2	0	0
S_r	1,770	2,306	1,745	7,758	50,548
RSD_r (%)	1,96	5,06	4,50	2,38	2,15
r	4,96	6,46	4,89	21,72	141,54
S_R	15,287	7,066	8,236	23,614	213,990
RSD_R (%)	16,90	15,52	21,22	7,26	9,09
R	42,80	19,79	23,06	66,12	599,17

ANNEXE D

Références

ISO 5725-1:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 1 : Principes généraux et définitions

ISO 5725-2:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 2 : Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-5:1998 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 5 : Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-6:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 6 : Utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude