RÈGLEMENT (CEE) N° 1058/77 DE LA COMMISSION

du 18 mai 1977

relatif aux caractéristiques des huiles d'olive et de certains produits contenant de l'huile d'olive et modifiant la nomenclature du tarif douanier commun en ce qui concerne l'huile d'olive

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu le règlement n° 136/66/CEE du Conseil, du 22 septembre 1966, portant établissement d'une organisation commune des marchés dans le secteur des matières grasses (1), modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 1707/73 (2), et notamment ses articles 13 paragraphe 4 et 18 paragraphe 3,

vu le règlement n° 162/66/CEE du Conseil, du 27 octobre 1966, relatif aux échanges des matières grasses entre la Communauté et la Grèce (3), et notamment ses articles 3 paragraphe 4 et 9,

vu le règlement (CEE) n° 443/72 du Conseil, du 29 février 1972, relatif aux prélèvements applicables à l'huile d'olive ayant subi un processus de raffinage, ainsi qu'à certains produits contenant de l'huile d'olive (4), et notamment son article 8,

considérant que, à l'heure actuelle, toutes les huiles d'olive vierges sont incluses dans la sous-position 15.07 A II a) du tarif douanier commun ; que, de ce fait, un seul prélèvement est fixé pour ces produits ; que, afin de permettre au prélèvement à l'importation d'atteindre son objectif, il convient de le fixer suivant les divers types d'huile vierge et, à cette fin, de distinguer les huiles d'olive suivant leurs caractéristiques physicochimiques ; qu'il y a lieu, en conséquence, d'adapter la nomenclature du tarif douanier commun ;

considérant que la nomenclature tarifaire résultant de l'application du règlement n° 136/66/CEE est reprise dans le tarif douanier commun annexé au règlement (CEE) n° 950/68 (5), modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 874/77 (6) ;

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

considérant que le règlement (CEE) n° 618/72 de la Commission, du 29 mars 1972, relatif aux caractéristiques des huiles d'olive ainsi que de certains produits contenant de l'huile d'olive (7), a été modifié à plusieurs reprises, notamment par le règlement (CEE) n° 3366/75 (8) ; que, compte tenu des nouvelles modifications à y apporter il a été jugé opportun de l'abroger et de reprendre dans un nouveau règlement l'ensemble des dispositions ;

considérant que les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité de gestion des matières grasses,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT :

Article premier

1. Est seule considérée comme huile d'olive, au sens de la sous-position 15.07 A du tarif douanier commun, l'huile provenant uniquement du traitement des olives, à l'exclusion de l'huile d'olive réestérifiée et de tout mélange d'huile d'olive avec des huiles d'autre nature.

La mise en évidence de la présence d'huile d'olive réestérifiée ou d'huiles d'autre nature est effectuée au moyen des méthodes reprises respectivement aux annexes VII et VIII.

2. Relèvent des sous-positions 15.07 A I a), 15.07 A I b) et 15.07 A I c) du tarif douanier commun les huiles qui ont les caractéristiques indiquées à l'annexe I points 1, 2 et 3. Pour la détermination des caractéristiques visées ci-dessus, sont utilisées les méthodes décrites aux annexes IV, V et VI.

3. Relèvent de la sous-position 15.07 A II a) du tarif douanier commun les huiles qui ont les caractéristiques reprises à l'annexe I point 4.

4. Ne relèvent pas de la sous-position 15.17 A du tarif douanier commun les produits de la position 15.17 ayant les caractéristiques indiquées à l'annexe II.

Article 2

1. La teneur en huile d'olive des grignons et des autres résidus de l'extraction de l'huile d'olive relevant de la sous-position 23.04 A est déterminée conformément à la méthode figurant à l'annexe IX.

(1) JO n° 172 du 30. 9. 1966, p. 3025/66.
(2) JO n° L 175 du 29. 6. 1973, p. 5.
(3) JO n° 197 du 29. 10. 1966, p. 3393/66.
(4) JO n° L 54 du 3. 3. 1972, p. 3.
(5) JO n° L 172 du 22. 7. 1968, p. 1.
(6) JO n° L 106 du 29. 4. 1977, p. 20.
(7) JO n° L 78 du 31. 3. 1972, p. 5.
(8) JO n° L 333 du 30. 12. 1975, p. 13.

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

Article 3

Le tarif douanier commun annexé au règlement (CEE) n° 950/68 est modifié comme suit :

1. À la note complémentaire 1 du chapitre 15, les termes « du n° 15.07 » sont remplacés par « de la sous-position 15.07 D ».
2. Les notes complémentaires 2, 3 et 4 du chapitre 15 sont remplacées par les notes complémentaires 2, 3 et 4 figurant à l'annexe III du présent règlement.
3. La sous-position 15.07 A est remplacée par le texte suivant :

Numéro tarif	Description	Taux des droits	
		autonomes % ou prélèvement (P)	conventionnels %
1	2	3	4
15.07	A. Huile d'olive :		
	I. non traitée :		
	a) Huile d'olive vierge	20 (P)	—
	b) Huile d'olive vierge lampante	20 (P)	—
	c) autre	20 (P)	—
	II. autre :		
	a) obtenue par traitement des huiles des sous-positions 15.07 A I a) ou 15.07 A I b), même coupée d'huile d'olive vierge	20 (P)	—
	b) non dénommée	20 (P)	—

Article 4

Dans tous les actes communautaires où il est fait référence aux sous-positions 15.07 A II ou 15.07 A I a) et b) du tarif douanier commun, ces références sont à considérer comme se rapportant, selon les caractéristiques du produit concerné, respectivement aux sous-positions 15.07 A I a), b) et c) et 15.07 A II a) et b) du tarif douanier commun.

Article 5

Le règlement (CEE) n° 618/72 de la Commission est abrogé.

Article 6

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

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

Fait à Bruxelles, le 18 mai 1977.

Par la Commission

Finn GUNDELACH

Vice-président

ANNEXES

Sommaire

		Pages
ANNEXE I :	Caractéristiques des huiles d'olive	9
ANNEXE II :	Produits de la sous-position 15.17 A	10
ANNEXE III :	Notes complémentaires 2, 3 et 4 du chapitre 15 du tarif douanier commun	10
ANNEXE IV :	I. Traitement de l'échantillon par l'alumine activée	12
	II. Neutralisation et décoloration de l'huile d'olive en laboratoire	12
ANNEXE V :	Recherche de la présence d'huile de grignons d'olive dans les huiles d'olive	14
	A. Méthode dite « de Bellier »	14
	B. Méthode dite « de Vizern modifiée »	14
ANNEXE VI :	Recherche des savons par la mise en évidence de l'alcalinité	16
ANNEXE VII :	Recherche de la présence des huiles réestérifiées	16
ANNEXE VIII :	Recherche de la présence d'autres huiles dans l'huile d'olive : analyse de la fraction stérolique des corps gras	20
ANNEXE IX :	Teneur en huile des grignongs d'olive	24

ANNEXE I

CARACTÉRISTIQUES DES HUILES D'OLIVE

1. Est considérée comme huile d'olive vierge, au sens de la sous-position 15.07 A I a) du tarif douanier commun, l'huile d'olive naturelle obtenue uniquement par des procédés mécaniques, y compris la pression, à l'exclusion de tout mélange avec de l'huile d'olive obtenue de façon différente, présentant les caractéristiques suivantes :

   a) une teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique, non supérieure à 3 % ;

   b) un coefficient d'extinction K_{270} [absorbance sous une épaisseur de 1 cm d'une solution à 1 g d'huile pour 100 ml dans l'isooctane (2,2,4 triméthylpentane) pour la longueur d'onde de 270 nm] non supérieur à 0,25 et, après traitement de l'échantillon d'huile sur alumine activée, non supérieur à 0,11 ;

   c) une variation du coefficient d'extinction au voisinage de 270 nm non supérieure à 0,01.

   Cette variation est définie par :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

   K_m désigne le coefficient d'extinction à la longueur d'onde du maximum de la courbe d'absorption au voisinage de 270 nm,

   K_{m-4} et K_{m+4} désignent les coefficients d'extinction aux longueurs d'onde inférieure et supérieure de 4 nm à celle de K_m ;

   d) réactions de Bellier et de Vizern modifiée négatives, effectuées conformément aux méthodes reprises à l'annexe V sous A et B ;

   e) une recherche des savons négative, effectuée conformément à la méthode décrite à l'annexe VI.

2. Est considérée comme huile d'olive vierge lampante, au sens de la sous-position 15.07 A I b) du tarif douanier commun, quelle que soit son acidité, l'huile d'olive présentant les caractéristiques suivantes :

   a) un coefficient d'extinction K_{270} supérieur à 0,25 et, après traitement de l'échantillon sur alumine activée, non supérieur à 0,11.

   Des huiles ayant une teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique, supérieure à 3 % peuvent avoir, après passage sur alumine activée, un coefficient d'extinction K_{270} supérieur à 0,11. Dans ce cas, après neutralisation et décoloration effectuées en laboratoire, conformément à la méthode reprise à l'annexe IV, elles doivent avoir les caractéristiques suivantes :

   — un coefficient d'extinction K_{270} non supérieur à 1,10,

   — une variation du coefficient d'extinction au voisinage de 270 nm supérieure à 0,01 et non supérieure à 0,16 ;

   b) réactions de Bellier et de Vizern modifiée négatives, effectuées conformément aux méthodes reprises à l'annexe V sous A et B ;

   c) une recherche des savons négative, effectuée conformément à la méthode décrite à l'annexe VI.

3. Sont considérées comme relevant de la sous-position 15.07 A I c) du tarif douanier commun les huiles, notamment les huiles de « grignons d'olive », présentant les caractéristiques suivantes :

   a) une teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique, supérieure à 3 % ;

   b) réactions de Bellier et de Vizern modifiée positives, effectuées conformément aux méthodes reprises à l'annexe V sous A et B ;

   c) une recherche des savons négative, effectuée conformément à la méthode reprise à l'annexe VI.

4. Est considérée comme relevant de la sous-position 15.07 A II a) du tarif douanier commun l'huile d'olive obtenue par traitement des huiles des sous-positions 15.07 A I a) et 15.07 A I b), même coupée d'huile d'olive vierge, présentant les caractéristiques suivantes :

   a) une teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique, de 3 % au maximum ;

   b) une recherche des savons positive, effectuée conformément à la méthode décrite à l'annexe VI,

ou :

— un coefficient d'extinction K_{270} supérieur à 0,25 et non supérieur à 1,10 et, après traitement de l'échantillon d'huile sur alumine activée, supérieur à 0,11,

et

— une variation du coefficient d'extinction au voisinage de 270 nm supérieure à 0,01 et non supérieure à 0,16.

Cette variation est définie par :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

K_m désigne le coefficient d'extinction à la longueur d'onde du maximum de la courbe d'absorption au voisinage de 270 nm,

K_{m-4} et K_{m+4} désignent les coefficients d'extinction aux longueurs d'onde inférieure et supérieure de 4 nm à celle de K_m ;

c) réactions de Bellier et de Vizern modifiée négatives, effectuées conformément aux méthodes reprises à l'annexe V sous A et B.

ANNEXE II

PRODUITS DE LA SOUS-POSITION 15.17 A

Sont exclus de la sous-position 15.17 A :

a) les résidus provenant du traitement des corps gras contenant de l'huile dont l'indice d'iode, déterminé selon la méthode de Wijs sans catalyseur, est inférieur à 70 ou supérieur à 100 ;

b) les résidus provenant du traitement des corps gras contenant de l'huile dont l'indice d'iode est compris entre 70 et 100 mais dont la surface du pic ayant le volume de rétention du bêta-sitostérol, déterminée conformément aux dispositions de l'annexe VIII, représente moins de 93 % de la surface totale des pics des stérols.

ANNEXE III

NOTES COMPLÉMENTAIRES 2, 3 ET 4 DU CHAPITRE 15 DU TARIF DOUANIER COMMUN

2. A. Est seule considérée comme huile d'olive, au sens de la sous-position 15.07 A, l'huile provenant exclusivement du traitement des olives, à l'exclusion de l'huile d'olive réestérifiée et de tout mélange d'huile d'olive avec des huiles d'une autre nature.

B. Sont considérées comme huiles d'olive non traitées les huiles définies aux points I, II et III ci-après.

I. Est seule considérée comme huile d'olive vierge, au sens de la sous-position 15.07 A I a), l'huile d'olive naturelle obtenue uniquement par des procédés mécaniques, y compris la pression, à l'exclusion de tout mélange avec de l'huile d'olive obtenue de façon différente, présentant les caractéristiques suivantes :

a) une teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique, de 3 % au maximum ;

b) un coefficient d'extinction K_{270} [absorbance sous une épaisseur d'un centimètre d'une solution d'un gramme d'huile pour 100 millilitres dans l'isooctane (2,2,4 triméthylpentane) pour la longueur d'onde de 270 nanomètres] non supérieur à 0,25 et, après traitement de l'échantillon d'huile sur alumine activée, non supérieur à 0,11 ;

c) une variation du coefficient d'extinction au voisinage de 270 nanomètres non supérieure à 0,01.

Cette variation est définie par :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

K_m désigne le coefficient d'extinction à la longueur d'onde du maximum de la courbe d'absorption au voisinage de 270 nanomètres ;

K_{m-4} et K_{m+4} désignent les coefficients d'extinction aux longueurs d'onde inférieure et supérieure de 4 nanomètres à celle de K_m ;

d) réactions de Bellier et de Vizern modifiée négatives ;

e) une recherche des savons négative.

II. Est considérée comme huile d'olive vierge lampante, au sens de la sous-position 15.07 A I b), quelle que soit son acidité, l'huile d'olive présentant les caractéristiques suivantes :

a) un coefficient d'extinction K_{270} supérieur à 0,25 et, après traitement de l'échantillon sur alumine activée, non supérieur à 0,11. Des huiles ayant une teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique, supérieure à 3 % peuvent avoir, après passage sur alumine activée, un coefficient d'extinction K_{270} supérieur à 0,11. Dans ce cas, après neutralisation et décoloration effectuées en laboratoire, elles doivent avoir les caractéristiques suivantes :

— un coefficient d'extinction K_{270} non supérieur à 1,10,

— une variation du coefficient d'extinction au voisinage de 270 nanomètres supérieure à 0,01 et non supérieure à 0,16 ;

b) réactions de Bellier et de Vizern modifiée négatives ;

c) une recherche des savons négative.

III. Sont considérées comme produits relevant de la sous-position 15.07 A I c) les huiles, notamment les huiles de « grignons d'olive », présentant les caractéristiques suivantes :

a) une teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique, supérieure à 3 % ;

b) réactions de Bellier et/ou de Vizern modifiée positives ;

c) une recherche des savons négative.

C. Relève de la sous-position 15.07 A II a) l'huile d'olive obtenue par le traitement des huiles des sous-positions 15.07 A I a) et/ou 15.07 A I b), même coupées d'huile d'olive vierge, présentant les caractéristiques suivantes :

a) une teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique, de 3 % au maximum ;

b) une recherche des savons positive

ou :

— un coefficient d'extinction K_{270} supérieur à 0,25 et non supérieur à 1,10 et, après traitement de l'échantillon sur alumine activée, supérieur à 0,11,

et

— une variation du coefficient d'extinction au voisinage de 270 nanomètres supérieure à 0,01 et non supérieure à 0,16.

Cette variation est définie par :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

K_m désigne le coefficient d'extinction à la longueur d'onde du maximum de la courbe d'absorption au voisinage de 270 nanomètres,

K_{m-4} et K_{m+4} désignent les coefficients d'extinction aux longueurs d'onde inférieure et supérieure de 4 nanomètres à celle de K_m ;

c) réactions de Bellier et de Vizern modifiée négatives.

3. Sont exclus de la sous-position 15.17 A :

   a) les résidus provenant du traitement des corps gras contenant de l'huile dont l'indice d'iode, déterminé selon la méthode de Wijs sans catalyseur, est inférieur à 70 ou supérieur à 100 ;

   b) les résidus provenant du traitement des corps gras contenant de l'huile dont l'indice d'iode est compris entre 70 et 100 mais dont la surface du pic ayant le volume de rétention du bêta-sitostérol, déterminée conformément aux dispositions reprises à l'annexe VIII du règlement visé à la note complémentaire 4 ci-dessous, représente moins de 93 % de la surface totale des pics des stérols.

4. Les méthodes d'analyse pour la détermination des caractéristiques des produits visés ci-dessus sont celles prévues repectivement aux annexes du règlement (CEE) n° 1058/77.

ANNEXE IV

I. TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON PAR L'ALUMINE ACTIVÉE

1. Introduire 30 g d'alumine basique, obtenue selon le procédé décrit au paragraphe 2, dans une colonne à chromatographie de 35 mm environ de diamètre et de 450 mm de longueur, munie d'un tube d'écoulement de 10 mm environ de diamètre.

   Tasser mécaniquement l'alumine, en laissant tomber doucement la colonne maintenue verticale, de façon répétée, sur une surface de bois. Introduire, dans la colonne ainsi préparée, 100 ml d'une solution à 10 % d'huile dans l'hexane.

   Recueillir l'éluat et évaporer le solvant sous vide à une température inférieure à 25 °C.

   Sur l'huile ainsi obtenue, la détermination du coefficient d'extinction à 270 nm doit être faite immédiatement.

2. On obtient l'alumine basique d'activité Brockmann I (0 % d'eau) en chauffant pendant trois heures à 380-400 °C de l'alumine basique (pour chromatographie) de granulométrie comprise entre 30 µm et 130 µm (80 µm de moyenne). À 100 g de ce produit, ajouter 5 ml d'eau distillée pour obtenir de l'alumine basique d'une activité Brockmann comprise entre II et III. Agiter fréquemment et laisser reposer une nuit dans un récipient hermétiquement fermé.

   Vérification de l'activité de l'alumine

   Introduire 30 g d'alumine basique (obtenue de la manière indiquée ci-dessus) dans une colonne pour chromatographie de 35 mm environ de diamètre et de 450 mm de longueur, faire passer à travers cette colonne, dans les conditions spécifiées par la méthode, un mélange de 95 % d'huile d'olive vierge ayant un coefficient d'extinction K_{270} inférieur à 0,18 et de 5 % d'une huile d'arachide traitée lors de son raffinage par les terres décolorantes et ayant un coefficient d'extinction K_{270} non inférieur à 4. Si le mélange présente un coefficient d'extinction supérieur à 0,11, l'alumine est acceptable. Si l'élution des triènes conjugués sur cette alumine ne s'est pas produite, il faut utiliser une alumine plus hydratée, après avoir vérifié si elle satisfait aux exigences du test précédent.

II. NEUTRALISATION ET DÉCOLORATION DE L'HUILE D'OLIVE EN LABORATOIRE

A. NEUTRALISATION DE L'HUILE

1. **Appareillage**

   — becher de 300 ml de forme haute,
   — centrifugeuse de laboratoire avec tubes de 100 ml,
   — becher de 250 ml,
   — ballons de 100 ml,
   — ampoule à décanter d'un litre.

2. **Réactifs**

— solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 12 %,
— solution éthanolique à 1 % de phénolphtaléine,
— hexane pur pour analyse,
— alcool isopropylique pur pour analyse.

3. **Mode opératoire**

a) *Huiles d'acidité exprimée en acide oléique inférieure à 30 %*

Introduire, dans un becher de 300 ml de forme haute, 50 g d'huile brute et chauffer à 65 °C au bain-marie. En agitant lentement, ajouter une quantité de solution d'hydroxyde de sodium à 12 % correspondant à l'acidité libre de l'huile, avec un excès de 5 %. Continuer à agiter pendant cinq minutes, en maintenant la température à 65 °C.

Transférer le tout dans des tubes à centrifuger de 100 ml, séparer la pâte savonneuse par centrifugation. Verser l'huile décantée dans un becher de 250 ml et laver avec 50-60 ml d'eau distillée bouillante tout en éliminant la couche aqueuse à l'aide d'un siphon. Répéter les lavages jusqu'à élimination complète des traces de savon résiduel (disparition de la coloration rose à la phénolphtaléine).

Centrifuger l'huile pour éliminer les petites quantités d'eau résiduelle.

b) *Huiles d'acidité exprimée en acide oléique supérieure à 30 %*

Dans une ampoule à décanter d'un litre, introduire 50 g d'huile brute, 200 ml d'hexane, 100 ml d'alcool isopropylique et une quantité de solution d'hydroxyde de sodium à 12 % correspondant à l'acidité libre de l'huile, avec un excès de 0,3 %. Agiter énergiquement pendant une minute. Ajouter 100 ml d'eau distillée, agiter de nouveau et laisser reposer.

Après séparation des couches, laisser s'écouler la couche inférieure contenant les savons. Entre les deux couches (huileuse au-dessus et aqueuse au-dessous) se forme souvent une couche intermédiaire constituée de mucilages et de substances insolubles qui doit également être éliminée.

Procéder ensuite au lavage de la solution hexanique d'huile neutre avec des portions de 50-60 ml d'une solution d'alcool isopropylique/eau distillée 1/1 (v/v) jusqu'à disparition de la coloration rose à la phénolphtaléine. Procéder ensuite à l'élimination complète de l'hexane par distillation sous vide (par exemple, à l'évaporateur rotatif).

B. DÉCOLORATION DE L'HUILE NEUTRALISÉE

1. **Appareillage**

— ballon de 250 ml à 3 cols rodés permettant d'insérer :
  a) un thermomètre gradué en degrés et permettant de faire des lectures jusqu'à 90 °C ;
  b) un agitateur mécanique tournant à 250-300 tours par minute équipé pour le fonctionnement sous vide ;
  c) un raccord vers la pompe à vide,
— pompe à vide, munie d'un manomètre, capable de donner des pressions résiduelles de 15-30 millibars.

2. **Mode opératoire**

Peser dans le ballon à 3 cols 100 g environ de l'huile neutralisée. Insérer le thermomètre et l'agitateur, relier à la pompe à vide et chauffer jusqu'à 90 °C en agitant.

Maintenir cette température, toujours sous agitation, jusqu'à ce que l'huile à analyser soit totalement débarrassée de son humidité (trente minutes environ).

Interrompre alors le vide et ajouter 2 à 3 g de terre activée. Rétablir le vide jusqu'à obtention d'une pression résiduelle de 15-30 millibars et, toujours à la température de 90 °C, agiter pendant trente minutes à 250 tours par minute environ.

Filtrer ensuite à chaud dans une étuve thermostatique (50-60 °C)

ANNEXE V

RECHERCHE DE LA PRÉSENCE D'HUILE DE GRIGNONS D'OLIVE DANS LES HUILES D'OLIVE

A. MÉTHODE DITE DE BELLIER

1. **Matériel**

— ballon de 100 ml, muni d'un réfrigérant à reflux,

— pipette de 5 ml graduée en dixièmes,

— système chauffant permettant d'atteindre la température de 80 °C environ,

— thermomètre de 15 à 60 °C.

2. **Réactifs**

— solution hydro-alcoolique de potasse (42,5 g de KOH dissous dans 72 ml d'eau distillée, le volume étant complété à 500 ml avec de l'alcool éthylique à 95°),

— solution d'alcool éthylique, titrant 70°,

— solution aqueuse d'acide acétique 1 + 2 (en volume), ajustée de façon que 1,5 ml neutralisent exactement 5 ml de la solution hydro-alcoolique d'hydroxyde de potassium en présence de phénolphtaléine.

3. **Préparation de l'échantillon**

L'huile est privée d'eau par décantation et filtration sur papier effectuées à une température légèrement supérieure au point de fusion de certains constituants concrets qui auraient pu se séparer de la matière grasse fluide.

4. **Mode opératoire**

Introduire dans le ballon 1 ml environ d'huile préparée comme indiqué au paragraphe 3. Ajouter 5 ml de solution hydro-alcoolique de potasse. Adapter le réfrigérant à reflux et porter à ébullition pendant dix minutes en agitant de temps en temps. Laisser refroidir jusqu'à la température ambiante Ajouter 1,5 ml de solution aqueuse d'acide acétique et 50 ml de solution d'alcool éthylique préalablement amenée à la température de 50 °C. Mélanger par agitation, introduire le thermomètre et laisser refroidir, en observant l'aspect de la solution dès qu'elle atteint la température de 45 °C. Si un précipité floconneux se forme à une température supérieure à 40 °C, la réaction est positive. En l'absence d'un précipité floconneux caractérisé, maintenir le liquide à température ambiante, qui doit être comprise entre 20 et 22 °C pendant au moins vingt-quatre heures, et si nécessaire pendant quarante-huit heures. Observer à nouveau la solution : la formation d'un précipité floconneux en suspension au milieu du liquide indique également que la réaction est positive.

Expression des résultats

Recherche de l'huile de grignons (méthode de Bellier) positive ou négative.

B. MÉTHODE DITE DE VIZERN MODIFIÉE

L'insaponifiable de l'huile à analyser est isolé et son comportement en solution dans l'alcool à 85° est étudié dans certaines conditions.

1. **Matériel**

— ballons de 300 ml en verre résistant aux alcalins et muni d'un réfrigérant à reflux,

— ampoules à décantation de 500 ml ou de 1 000 ml,

— bechers de 300 ml et de 250 ml,

— éprouvette en verre.

2. **Réactifs**

— solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2N,

— éther de pétrole,

— alcool éthylique à 50 %,

— alcool éthylique à 96° mesuré à l'alcoomètre,

— eau oxygénée à 10 volumes,

— alcool éthylique à 85° mesuré à l'alcoomètre.

3. **Mode opératoire**

Peser environ 5 g de l'échantillon à analyser dans un ballon de 300 ml. Ajouter 50 ml de la solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2N. Monter le réfrigérant à reflux et porter à légère ébullition. Agiter après une heure de chauffage, refroidir à 30-35 °C et transvaser dans une ampoule à décantation en utilisant 50 ml d'eau distillée.

Laver soigneusement le ballon avec 50 ml d'éther de pétrole, répéter l'opération à plusieurs reprises. Transvaser l'éther de pétrole dans une ampoule à décantation. Agiter énergiquement le contenu un peu plus d'une minute. Après décantation, éliminer la phase aqueuse en la transvasant dans une deuxième ampoule à décantation. Ajouter encore 50 ml d'éther de pétrole, agiter énergiquement le contenu un peu plus d'une minute et laisser décanter. La phase aqueuse est transvasée dans une troisième ampoule à décantation à laquelle on ajoute encore 50 ml d'éther de pétrole. Agiter énergiquement ensuite et laisser décanter.

Recueillir dans une ampoule à décantation les extraits éthérés provenant des différentes extractions de l'insaponifiable et laver au moins trois fois avec de l'alcool à 50 % (50 ml à chaque fois) jusqu'à ce que le liquide de lavage ne donne plus de réaction alcaline à la phénolphtaléine.

Filtrer la solution de l'insaponifiable dans un becher de 300 ml, laver le filtre avec de l'éther de pétrole et éliminer le solvant par distillation. Ajouter 10 ml d'alcool à 96° et après chauffage modéré (environ 40 °C), filtrer dans un becher de 100 ml. Laver le becher de 300 ml avec 10 ml d'alcool à 96° et filtrer ensuite dans le deuxième becher.

Dans le becher de 100 ml contenant les extraits alcooliques de l'insaponifiable, ajouter 5 ml d'eau oxygénée à 10 volumes, chauffer au bain-marie jusqu'à évaporation complète. Ajouter encore 20 ml d'alcool à 96° et 5 ml d'eau oxygénée ; laisser de nouveau évaporer complètement.

Retirer le becher du bain-marie et ajouter 20 ml d'alcool à 85°. Chauffer prudemment au bain-marie en faisant très attention de ne pas provoquer des pertes d'alcool pour ne pas diminuer la concentration. Il s'agit d'un élément très important qu'il ne faut pas négliger.

Filtrer sur papier, refroidir et examiner le comportement de la solution au bout d'une heure, puis de quatre heures. Si, après une heure, la solution est absolument transparente, l'analyse est négative, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'huile de grignons.

Si, après une heure, la solution est trouble, répéter l'observation quatre heures après.

Si, au bout de quatre heures, la solution est encore trouble, mais ne présente pas de flocons, l'analyse est encore négative. En revanche, si on observe la formation de flocons, l'analyse est positive et l'on se trouve en présence d'huile de grignons.

Expression des résultats

Recherche de l'huile de grignons (méthode de Vizern modifiée) : positive ou négative.

Observations

Les huiles d'olive donnent une solution transparente ou au maximum légèrement opaline pendant tout l'essai. Les huiles de grignons pures ou mélangées présentent des flocons caractéristiques qui restent en suspension comme des petits nuages et qui finissent par se déposer au bout de plusieurs heures de repos.

ANNEXE VI

RECHERCHE DES SAVONS PAR LA MISE EN ÉVIDENCE DE L'ALCALINITÉ

Principe de la méthode

Mise en évidence des savons alcalins par action sur le bleu de bromophénol.

Réactifs

— solution à 0,1 % de bleu de bromophénol dans l'étahanol à 96 % (v/v),

— acétone fraîchement distillée, additonnée de 2 % d'eau (v/v).

L'acétone à 2 % d'eau doit présenter une teinte jaune ou jaune verdâtre en présence de quelques gouttes de la sclution de bleu de bromophénol.

Matériel

Tube à essai de 150 mm × 15 mm.

Mode opératoire

Introduire dans le tube à essai 10 ml d'acétone et 1 goutte de solution de bromophénol. La solution devrait virer au jaune. Sinon, rincer le tube et le bouchon avec de l'acétone jusqu'à disparition de la coloration bleue. Introduire 10 g d'huile dans le tube, l'obturer à l'aide d'un bouchon propre, agiter et laisser reposer. Un virage au bleu dans la couche supérieure d'acétone indique la présence de savon.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés comme positifs ou négatifs.

ANNEXE VII

RECHERCHE DE LA PRÉSENCE DES HUILES RÉESTÉRIFIÉES

La méthode a pour but de déterminer, dans les huiles et graisses, la composition de la fraction des acides gras qui sont estérifiés sur la position 2 (position β, ou position interne) du glycérol, les huiles d'olive réestérifiées contenant plus d'acide palmitique en position β que les huiles d'olive non réestérifiées.

Principe

Cette méthode repose sur l'hydrolyse partielle et spécifique des triglycérides par la lipase pancréatique avec formation préférentielle de mono-2 glycérides. Cette hydrolyse conduit à un mélange renfermant, à côté des triglycérides non hydrolysés, des diglycérides, des mono-2 glycérides et des acides gras libres. Ce mélange est fractionné par chromatographie en couche mince et les monoglycérides isolés. Ces monoglycérides sont méthanolysés, et les esters méthyliques obtenus sont analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Le produit analysé doit être considéré comme ayant été additionné d'huile réestérifiée lorsque le pourcentage d'acide palmitique constaté dans la position 2 des triglycérides est supérieur à 2 %.

1. Matériel

— ampoule à décanter de 500 ml,

— colonne en verre pour chromatographie de 13 mm de diamètre intérieur et de 400 mm de longueur, équipée d'une plaque en verre fritté et d'un robinet,

— ballon de 250 ml à col large,

— ballon de 100 ml,

— tube de centrifugeuse de 10 ml, avec bouchon rodé,

— seringue hypodermique de 1 ml, équipée d'une aiguille mince,

— ballon de 25 ml, avec réfrigérant à air d'environ 1 m de longueur avec raccord rodé,

— becher de 50 ml,
— burette de 5 ml, graduée en 1/20 ml,
— étaleur pour chromatographie en couche mince, avec plaques de verre de 20 × 20 cm,
— microseringue délivrant des gouttes de 3-4 µl,
— cuve de développement pour chromatographie en couche mince,
— évaporateur rotatif,
— étuve réglable à 103 °C ± 2 °C,
— thermostat réglable entre 30 °C et 45 °C à ± 0,5 °C,
— agitateur électrique vibrant permettant une agitation énergique du tube de centrifugeuse,
— pulvérisateur pour chromatographie en couche mince,
— lampe ultraviolette pour l'examen des plaques chromatographiques,
— agitateur de laboratoire, d'un type convenable pour la dispersion et le mélange de matériaux hétérogènes,
— pH-mètre,
— agitateur à hélice,
— chronomètre.

2. **Réactifs**

— solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 12 % (m/v),
— solution à 1 % (m/v) de phénolphtaléine dans l'éthanol à 95 % (v/v),
— oxyde diéthylique, exempt de peroxydes,
— alcool isopropylique, ou alcool éthylique à 95 % (v/v), pour analyses,
— alumine activée pour chromatographie, neutre, de degré d'activité Brockmann I, récemment activée pendant deux heures à 260 °C et conservée dans un dessicateur,
— hexane, ou à défaut éther de pétrole (Eb = 30-50 °C), pour chromatographie,
— acide formique à 98 % (m/m) au minimum,
— lipase pancréatique d'activité convenable (note 1, note 2),
— solution tampon : solution aqueuse 1 M de tris- hydroxyméthyl-aminométhane amenée jusqu'à pH 8 par de l'acide chlorhydrique 6 N (contrôle potentiométrique),
— solution aqueuse à 0,1 % (m/v) de cholate de sodium (qualité enzymatique),
— solution d'acide chlorhydrique 6 N,
— solvant de développement : hexane (ou, à défaut, éther de pétrole)/oxyde diéthylique/acide formique 70/30/1 (v/v/v),
— solution aqueuse de gomme arabique à 10 % (m/v),
— solution aqueuse de chlorure de calcium ($CACl_2$) à 22 % (m/v),
— solution alcoolique à 0,2 % (m/v) de dichloro-2'-7' fluorescéine, légèrement alcalinisée par addition d'une goutte d'hydroxyde de sodium 1N par 100 ml,
— silice en poudre, avec liant, de qualité pour chromatographie en couche mince,
— solution aqueuse de cholate de sodium à 20 % (m/v),
— solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 0,1 N,
— huile végétale neutralisée.

3. **Préparation de l'échantillon**

Échantillon d'acidité inférieure à 3 % : neutralisation directe sur alumine selon 3.2.

Échantillon d'activité supérieure à 3 % : neutralisation par les alcalis en présence de solvant selon 3.1, puis passage sur alumine selon 3.2.

3.1. *Neutralisation par les alcalis en présence de solvant*

Verser, dans une ampoule à décanter de 500 ml, 10 g environ d'huile brute, 100 ml d'hexane, ou, à défaut, d'éther de pétrole, 50 ml d'alcool isopropylique ou d'alcool éthylique à 95° quelques gouttes de la solution de phénolphtaléine et une quantité de la solution d'hydroxyde de sodium à 12 % correspondant à l'acidité libre de l'huile, plus un excès de 0,3 %. Agiter énergiquement pendant une minute ; ajouter 50 ml d'eau distillée, agiter à nouveau et laisser reposer.

Après décantation, éliminer la couche inférieure contenant les savons. Éliminer les éventuelles couches intermédiaires (mucilages et substances insolubles), laver la solution hexanique de l'huile neutralisée avec des portions successives 25 ou 30 ml d'une solution d'alcool isopropylique, ou éthylique, et d'eau distillée 1-1 (v/v) jusqu'à disparition de la coloration rosée de la phénolphtaléine.

Éliminer la plus grande partie de l'hexane par distillation sous vide, et sécher l'huile à 30-40 °C sous vide à l'aide d'un courant d'azote pur jusqu'à élimination totale du solvant.

3.2. *Passage sur alumine*

Préparer une suspension de 15 g d'alumine activée dans 50 ml d'hexane où, à défaut, d'éther de pétrole, et verser, en agitant, dans une colonne en verre pour chromatographie. Régulariser la répartition de l'alumine et laisser s'écouler le solvant jusqu'à 1-2 mm au-dessus du niveau supérieur de l'absorbant. Verser soigneusement dans la colonne une solution préparée environ quinze minutes avant par dissolution de 5 g d'huile dans 25 ml d'hexane ou, à défaut, d'éther de pétrole, et recueillir la totalité du liquide sortant de la colonne dans un ballon de 100 ml.

Éliminer la plus grande partie du solvant par distillation sous vide, puis sécher l'huile à 30-40 °C sous vide à l'aide d'un courant d'azote pur jusqu'à élimination totale du solvant.

4. Préparation des chromatoplaques

Placer, dans un ballon de 250 ml à col large, 30 g de silice en poudre avec liant et 60 ml d'eau distillée, et agiter jusqu'à obtention d'une bouillie bien homogène. Dégazer en maintenant sous le vide de la trompe à eau pendant une minute.

Étaler dans les conditions usuelles la bouillie sur les plaques au moyen de l'étaleur en réglant l'épaisseur de la couche à 0,25 mm.

La quantité de bouillie ci-dessus est suffisante pour la préparation de 5 plaques 20 × 20 cm.

Laisser sécher les plaques à l'air pendant environ quinze minutes et, ensuite, les sécher dans une étuve à 103 °C ± 2 °C pendant deux heures.

Conserver les plaques ainsi préparées dans un dessicateur.

5. Mode opératoire

5.1. *Hydrolyse par la lipase pancréatique*

Peser dans le tube de centrifugeuse de 10 ml environ 0,1 g de l'échantillon préparé.

Ajouter 20 mg de lipase et 2 ml de solution tampon. Agiter soigneusement et avec précaution, puis ajouter 0,5 ml de la solution de cholate de sodium à 0,1 % et 0,2 ml de la solution de chlorure de calcium. Fermer le tube par le bouchon rodé, secouer avec précaution (en évitant de mouiller le bouchon) et mettre immédiatement le tube dans le thermostat, réglé à 40 °C ± 0,5 °C, en agitant exactement pendant une minute.

Retirer le tube du thermostat et agiter énergiquement pendant deux minutes exactement.

Refroidir aussitôt sous un courant d'eau ; ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique 6 N et 1 ml d'oxyde diéthylique. Boucher et agiter énergiquement. Laisser reposer et prélever la phase organique supérieure à l'aide de la seringue.

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

Déposer l'extrait sur la plaque chromatographique à environ 1,5 cm du bord inférieur en ligne continue et uniforme afin d'obtenir une ligne de départ la plus fine possible.

Introduire la plaque dans la cuve de développement bien saturée et développer avec le solvant de développement jusqu'à 1 cm environ du bord supérieur. Le développement de la plaque doit se faire à la température d'environ 20 °C.

Sécher la plaque à l'air à la température de la cuve et pulvériser la solution de dichloro-2'-7' fluorescéine. Délimiter la bande des monoglycérides (Rf = 0,035 environ) sous lumière ultraviolette, les récupérer à l'aide d'une spatule métallique (en évitant d'enlever les composants restés sur la ligne de départ) et recueillir la silice dans le ballon de méthylation de 25 ml.

Transformer les monoglycérides en esters méthyliques en traitant directement dans les conditions de la méthode générale de préparation des méthyls esters des acides gras indiqués au point 7.3 la silice précédemment recueillie, puis procéder à la chromatographie en phase gazeuse des esters selon la méthode indiquée au point 7.4.

Déterminer sur le même échantillon la composition des acides gras totaux, dont la comparaison avec celle des acides gras en position 2 est utile pour l'interprétation des résultats obtenus.

6. Expression des résultats

Calculer la composition des acides gras en position 2 en % avec un chiffre décimal (note 3).

7. **Notes**

7.1. *Contrôle de l'activité lipasique*

Préparer une émulsion d'huile en agitant, dans un mélangeur adéquat pendant environ 10 minutes, un mélange constitué par 165 ml de la solution de gomme arabique à 10 %, 15 g de glace pilée et 20 ml d'une huile préalablement neutralisée.

Dans un becher de 50 ml, mettre successivement 10 ml de l'émulsion ci-dessus, 0,3 ml de solution de cholate de sodium à 20 % et 20 ml d'eau distillée.

Placer le becher dans un thermostat réglé à 37 °C ± 0,5 °C et introduire dans le becher les électrodes d'un pH-mètre et un agitateur à hélice.

À l'aide d'une burette de 5 ml, ajouter goutte à goutte une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N jusqu'à obtention d'un pH de 8,5.

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

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

La suspension de lipase mentionnée au paragraphe précédent est une suspension à 1 % en poids dans l'eau. Prendre pour chaque essai la quantité nécessaire de cette suspension pour que, en quatre ou cinq minutes environ, 1 ml de solution alcaline soit consommé. Normalement, ce résultat est obtenu avec 1 à 5 mg de poudre.

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

Activité A de la poudre utilisée, mesurée en unités lipase par mg :

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

V = nombre de ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N par minute, calculé à partir du graphique,

m = masse de la prise d'essai de poudre, en mg.

La lipase utilisée doit avoir une activité comprise entre 0,8 et 2 unités lipase par mg.

7.2. *Préparation de la lipase*

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

Refroidir à 0 °C 5 kg de pancréas frais de porc, débarrassés de la graisse solide et du tissu conjonctif qui les entourent, et les triturer dans un moulin à lames pour obtenir une pâte fluide. Agiter cette pâte à froid pendant quatre à six heures avec 2,5 l d'acétone anhydre, puis centrifuger. Extraire le résidu trois autres fois avec le même volume d'acétone, deux fois avec un mélange acétone-oxyde diéthylique 1/1 (v/v), et deux fois avec de l'oxyde diéthylique.

Sécher le résidu pendant quarante-huit heures sous vide pour obtenir une poudre stable qui doit être conservée au réfrigérateur.

7.3. *Préparation des esters méthyliques d'acides gras*

Selon la méthode décrite au point II de l'annexe VI du règlement (CEE) n° 72/77 de la Commission, du 13 janvier 1977, modifiant le règlement (CEE) n° 1470/68 relatif à la prise et à la réduction des échantillons ainsi qu'à la détermination de la teneur en huile, en impuretés et en humidité des graines oléagineuses [1].

7.4. *Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras*

Selon la méthode décrite au point III de l'annexe VI du règlement (CEE) n° 72/77.

---

[1] JO n° L 12 du 15. 1. 1977, p. 11.

ANNEXE VIII

RECHERCHE DE LA PRÉSENCE D'AUTRES HUILES DANS L'HUILE D'OLIVE : ANALYSE DE LA FRACTION STÉROLIQUE DES CORPS GRAS

Principe

Analyse par chromatographie en phase gazeuse des stérols préparés par chromatographie sur couches minces à partir de l'insaponifiable séché avec précaution.

Appareillage

1. appareillage pour la chromatographie sur couche mince, comprenant en particulier quatre plaques de verre de 20 × 20 × 0,4 cm, deux de 20 × 5 × 0,4 cm et une microseringue de 0,1 ml,
2. becher de 50 ml,
3. filtres poreux, porosité 3, diamètre 15 mm,
4. ballon de 100 ml,
5. éprouvette de centrifugeuse à fond conique de 10 ml, munie d'un bouchon rodé,
6. pipettes graduées de 1 ml,
7. appareil de chromatographie en phase gazeuse, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme avec un injecteur en argent ou en verre ou système d'injection directe sur la colonne et relié à un enregistreur,
8. colonne de chromatographie en phase gazeuse, en verre ou en acier inoxydable en U ou spirale, de 1 à 2 m de long et de 3 à 4 mm de diamètre intérieur, phase stationnaire de gomme de silicone [type méthyl (1)] stable jusqu'à au moins 300 °C, imprégnant au taux de 2 à 4 % une terre de diatomée calcinée, lavée aux acides et silanisée, de granulométrie 80/100 ou 100/120 mesh,

   Remarque : Certains types d'acier inoxydable pouvant provoquer des résultats erronés par détérioration des stérols, le verre est recommandé,
9. microseringue pouvant fournir des doses atteignant 5 ou 10µl.

Réactifs

1. chloroforme pour chromatographie,
2. benzène pour chromatographie,
3. heptane,
4. gel de silice (par exemple Kieselgel G),
5. solution de référence pour la chromatographie sur plaque constituée de cholestérol à 5 % dans le chloroforme,
6. acétone pour chromatographie,
7. solution à 0,1 % dans l'acool éthylique absolu de sel sodique de 2'7' dichlorofluorescéine,
8. pyridine,
9. hexaméthyldisilazane,
10. triméthyl chlorosilane,
11. solution pour le test de sensibilité : 1 mg de cholestérol par ml de n-pentane,
12. solution pour le test de la résolution des pics : 0,9 mg de phytostérols d'huile de colza et 0,1 mg de cholestérol par ml de n-pentane. Les stérols doivent être fraîchement préparés selon le procédé décrit sous B du mode opératoire,
13. solution pour le test de référence : 1 mg de phytostérols d'huile de tournesol par ml de n-pentane, fraîchement préparés comme cela est décrit sous B du mode opératoire.

Préparation des plaques pour chromatographie

Placer dans l'ordre, sur l'étaleur, une plaque 20 × 5 × 0,4 cm, quatre plaques 20 × 20 × 0,4 cm et une plaque 20 × 5 × 0,4 cm.

(1) Par exemple SE 30.

Dans un ballon de 500 ml à col large, placer 40 g de gel de silice et environ 80 ml d'eau. Agiter avec une baguette en verre, éventuellement avec un agitateur mécanique en verre jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Éliminer les gaz éventuels en faisant le vide à l'aide d'une trompe à eau pendant une minute au moins. Porter ensuite la suspension sur l'étaleur tout en réglant l'épaisseur à 0,5 mm et recouvrir uniformément les plaques. Laisser sécher les plaques à l'air pendant quinze minutes environ et sécher ensuite dans une étuve à 105 °C pendant deux heures. Conserver les plaques ainsi préparées dans un dessiccateur sous vide.

MODE OPÉRATOIRE

A. Préparation de l'insaponifiable

Introduction

On désigne sous le nom d'insaponifiable les substances solubles dans la matière grasse, lesquelles, après saponification, sont insolubles dans l'eau et solubles dans le solvant utilisé pour le dosage. Il comprend les constituants naturels des matières grasses (stérols, alcools, hydrocarbures), ainsi que les substances organiques non volatiles à 100 °C (huiles minérales) étrangères aux matières grasses qu'elles peuvent éventuellement contenir. Comme solvant, on utilise l'éther de pétrole ou bien l'oxyde d'éthyle. Il faut tenir compte que les résultats avec les deux solvants sont, dans la plupart des cas, différents et qu'on trouve des teneurs en % plus élevées avec l'oxyde d'éthyle. Pour l'huile d'olive, compte tenu des conditions climatiques où se trouvent la majorité des laboratoires d'analyses, l'éther de pétrole a été reconnu comme le solvant à employer.

Méthode à l'éther de pétrole

Matériel

— ballon d'environ 150 ml pouvant être adapté à un réfrigérant à reflux,

— ampoules à décantation d'environ 500 ml,

— étuve réglée à 103 °C ± 2 °C.

Réactifs

— solution éthanolique de KOH environ 2 N dans l'éthanol à 95 % (v/v). Le réactif ne devra pas être plus foncé que la couleur jaune paille,

— éther de pétrole distillant entre 40 et 60 °C, possédant un indice de brome inférieur à 1, exempt de résidu.

Mode opératoire

Peser exactement à 0,01 g près environ 5 g de matière grasse dans le ballon. Ajouter 50 ml de la solution éthanolique de KOH environ 2 N. Adapter au réfrigérant à reflux. Chauffer une heure à légère ébullition. Arrêter le chauffage. Ajouter par le haut du réfrigérant environ 50 ml d'eau distillée et agiter.

Transvaser après refroidissement dans une ampoule à décantation et rincer le ballon à plusieurs reprises, avec au total environ 50 ml d'éther de pétrole.

Agiter énergiquement pendant une minute.

Laisser reposer jusqu'à séparation complète des deux phases et recueillir la solution savonneuse dans une seconde ampoule à décantation. S'il se forme, par exception, une émulsion, la détruire par addition de petites quantités d'éthanol ou de solution concentrée d'hydroxyde de potassium.

Retirer l'extraction de la solution savonneuse encore deux fois avec chaque fois environ 50 ml d'éther de pétrole.

Réunir les 3 fractions éthérées dans une même ampoule, les laver à trois reprises avec environ 50 ml d'éthanol à 50 % (v/v).

Par le haut de l'ampoule, transvaser, en plusieurs fois si nécessaire, quantitativement la solution d'éther de pétrole dans un ballon de 250 ml taré (en effectuant des petits rinçages de l'ampoule avec de l'éther de pétrole).

Le solvant est éliminé en le chauffant prudemment sous vide, les résidus sont séchés à une température inférieure à 50 °C sous vide, en vue d'éviter des oxydations indésirables.

B. **Séparation de la fraction stérolique par chromatographie sur couche mince**

Introduire dans la cuve de développement le mélange heptane n/ acétone 85/15 ou benzol/acétone 95/5 (v/v) jusqu'à hauteur d'1 cm environ ; fermer à l'aide du couvercle et laisser reposer pendant trois heures au moins de façon que l'équilibre liquide/vapeur s'établisse. Il est également conseillé de fixer sur les surfaces intérieures de la chambre des bandes de papier filtre qui plongent dans l'éluant. Cette précaution offre l'avantage de réduire d'un tiers environ la durée de migration du front du liquide et de faire éluer les composants de façon plus uniforme.

Préparer entre-temps une solution à 5 % d'insaponifiable extrait à l'éther de pétrole dans le chloroforme. Prélever 0,3 ml environ de cette solution et la déposer à l'aide de la microseringue de 0,1 ml sur la plaque chromatographique à 1,5 cm environ du bord inférieur, en bande continue et uniforme de façon à obtenir une ligne de départ la plus mince possible. Selon la technique habituelle, déposer à une extrémité de la plaque quelques ml de la solution de référence contenant du cholestérol afin d'identifier le Rf de la fraction stérolique.

Placer la plaque dans la cuve de développement préparée comme indiqué ci-dessus. La température ambiante doit être de 20 °C environ. Fermer avec le couvercle et développer jusqu'à ce que le front du solvant soit arrivé à 1 cm environ du bord supérieur de la plaque. Retirer la plaque de la chambre de développement et laisser évaporer le solvant dans un courant d'azote chaud.

Révéler en vaporisant uniformément et avec précaution la solution alcoolique de sel sodique de la 2'7' dichlorofluorescéine sur la plaque. En examinant la plaque à l'ultraviolet, on détermine la position des stérols grâce à l'alignement avec la tache de cholestérol provenant de la solution de référence. Récupérer en grattant à l'aide d'une spatule métallique la bande des stérols. Introduire le gel de silice séparé dans un becher de 50 ml avec 15 ml de chloroforme chaud, agiter et transférer la totalité de gel de silice sur le filtre poreux et filtrer.

Laver trois fois le filtre chaque fois avec une portion de 15 ml de chloroforme chaud, tout en recueillant le filtrat dans un ballon de 100 ml.

Évaporer la solution chloroformique jusqu'à 4 à 5 ml et la verser dans l'éprouvette pour centrifugeuse munie d'un bouchon rodé, taré au préalable. Porter à sec en évaporant le solvant par un léger réchauffement dans un courant d'azote et peser la fraction stérolique ainsi obtenue.

C. **Analyse chromatographique en phase gazeuse des stérols**

1. *Préparation des triméthylsiléthers (TMSE)*

Pour chaque mg de stérol, ajouter dans l'éprouvette 0,02 ml de réactif pour la silanisation, composé d'un mélange de pyridine-hexaméthyllazane-triméthylchlorosilane 9/3/1 (v/v/v) en ayant soin d'éviter toute trace d'humidité. Placer l'éprouvette dans un dessiccateur pendant trente minutes environ, puis fermer, centrifuger pendant quelques minutes. Prélever, pour l'analyse à pratiquer ensuite, la solution restante.

2. *Conditions de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse*

Température de la colonne : 220 à 250 °C.

Température du système d'injection s'il est chauffé séparément : 20 à 40 °C au-dessus de la température de la colonne. Débit de l'azote : 30 à 60 ml par minute. Déconnecter le détecteur et équilibrer les nouvelles colonnes dans ces conditions pendant seize à vingt-quatre heures. Connecter le détecteur, allumer la flamme et régler les débits d'hydrogène, d'oxygène ou d'air de façon à obtenir une hauteur de flamme et une sensibilité convenables. Mettre en marche l'enregistreur et laisser se dérouler le papier à une vitesse appropriée ; ajouter le zéro et l'atténuateur. Si la ligne de base est stable, l'appareil est prêt à être utilisé.

3. *Test de sensibilité*

Prélever 5 ml de la solution du test de sensibilité, évaporer le solvant, traiter comme indiqué en 1 ; injecter 0,1 à 0,2 µl de la solution ainsi préparée (TMSE). Un pic de cholestérol doit seul apparaître sur le chromatogramme.

Régler l'atténuateur de façon à utiliser approximativement toute l'échelle de l'enregistreur.

4. *Test de résolution des pics*

Prélever 5 ml de la solution préparée pour le test de résolution.

Évaporer le solvant, traiter comme indiqué en 1.

Injecter 0,1 à 0,2 µl de la solution ainsi préparée (TMSE).

Les pics de cholestérol, de brassicastérol, de campestérol et de β -sitostérol doivent apparaître sur le chromatogramme. Mesurer les distances de rétention (distance du point d'injection au point de hauteur maximal du pic) des pics, d_{CH} pour le cholestérol, d_B pour le brassicastérol, d_C pour le campestérol et d_S pour le β -sitostérol et les largeurs à la base des pics (longueur de rétention entre les intersections avec la ligne de base des tangentes aux points d'inflexion situés sur les côtés avant et arrière du pic) ω_{CH} pour le cholestérol et ω_B pour le brassicastérol. La résolution des pics, exprimée par la formule :

$$PR = 2\,\frac{(d_B - d_{CH})}{\omega_B + \omega_{CH}}$$

doit être égale au moins à 1.

Calculer les temps de rétention relatifs (cholestérol = 1,00) pour le brassicastérol, le campestérol et le β-sitostérol.

5. *Test de référence*

Prélever 5 ml de la solution du test de référence, évaporer le solvant, traiter comme indiqué en 1, injecter 0,1 à 0,2 µl de la solution ainsi préparée (TMSE). Les pics de campestérol, de stigmasténol, de β-sitostérol et Δ 7 stigmasténol doivent apparaître sur le chromatogramme.

Mesurer les distances de rétention des pics, d_C pour le campestérol, d_{ST} pour le stigmasténol, d_S pour le β-sitostérol et d_{ST} - 7 pour le Δ 7 stigmasténol.

Calculer les temps de rétention relatifs qui sont approximativement :

cholestérol :	1,0,
brassicastérol :	1,1,
campestérol :	1,3,
stigmastérol :	1,4,
β-sitostérol :	1,6 (1)
Δ 7 stigmasténol :	1,8 (1).

6. *Analyse*

Injecter 0,1 à 0,2 µl de la solution TMSE des stérols à analyser et enregistrer le chromatogramme.

D. **Expression des résultats**

Pour l'interprétation de la composition de la fraction stérolique analysée, il ne faut pas relever des pics ayant des temps de rétention différents de ceux déterminés expérimentalement pour les 6 stérols susmentionnés.

La teneur en % en β-sitostérol est donnée par la formule :

$$\frac{\text{Aire du pic du β-sitostérol}}{\text{Somme des aires des six pics de stérols}} \times 100$$

Le contenu en β-sitostérol ne devra pas être inférieur à 93 % par rapport à la composition en % des stérols totaux.

(1) Si d'autres sterols ont, comme le Δ 5 avenasterol, dans ces conditions, le même volume de rétention que le β - sitosterol, ils sont comptes comme du β - sitosterol.

(2) Si d'autres sterols ont, dans ces conditions, le même volume de rétention que le Δ 7 stigmastenol, ils sont comptes comme du Δ 7 stigmastenol.

ANNEXE IX

TENEUR EN HUILE DES GRIGNONS D'OLIVE

Matériel

— appareil d'extraction approprié muni d'un ballon de 200 à 250 ml,
— bain à chauffage électrique (bain de sable, bain d'eau, etc.) ou plaque chauffante,
— balance analytique,
— étuve réglée à 80 °C au maximum,
— étuve à chauffage électrique muni d'un dispositif de thermorégulation réglé à 103 °C ± 2 °C et permettant de réaliser une insufflation d'air ou une pression réduite,
— broyeur mécanique facile à nettoyer et permettant le broyage sans échauffement et sans diminution sensible de leur teneur en eau et en huile,
— cartouche d'extraction et coton hydrophile ou papier filtre, exempts de produits extractibles à l'hexane,
— dessicateur,
— tamis à trous de 1 mm de diamètre,
— pierre ponce en petits grains, préalablement séchée.

Réactif

n-hexane technique dont le résidu à l'évaporation complète doit être inférieur à 0,002 g pour 100 ml.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de l'échantillon pour essai

Broyer l'échantillon pour laboratoire, si nécessaire, dans le broyeur mécanique préalablement bien nettoyé afin de le réduire en particules pouvant traverser complètement le tamis.

Utiliser un vingtième environ de l'échantillon pour parfaire le nettoyage du broyeur, rejeter cette mouture, broyer le reste, le recueillir, le mélanger avec soin et l'analyser sans délai.

Prise d'essai

Peser, à 0,01 g près, dès la fin du broyage, environ 10 g de l'échantillon pour essai.

Préparation de la cartouche d'extraction

Placer la prise d'essai dans la cartouche et boucher celle-ci avec le tampon de coton hydrophile. Dans le cas où on a utilisé un papier filtre, emballer la mouture dans ce papier.

Préséchage

Si le grignon est très humide (teneur en eau et en matières volatiles supérieure à 10 %), effectuer un préséchage en plaçant pendant un temps convenable la cartouche remplie (ou le papier filtre) dans l'étuve chauffée à 8 °C au maximum, pour ramener la teneur en eau et en matières volatiles au-dessous de 10 %.

Préparation du ballon

Peser, à 1 mg près, le ballon contenant 1 à 2 grains de pierre ponce, préalablement séché à l'étuve à 103 °C ± 2 °C puis refroidi pendant au moins une heure dans un dessiccateur.

Première extraction

Placer dans l'appareil d'extraction la cartouche (ou le papier filtre) contenant la prise d'essai. Verser dans le ballon la quantité nécessaire d'hexane. Adapter le ballon à l'appareil d'extraction et placer le tout sur le bain à chauffage électrique. Conduire le chauffage dans des conditions telles que le débit du reflux soit au moins de trois gouttes à la seconde (ébullition modérée, non tumultueuse).

Après quatre heures d'extraction, laisser refroidir. Enlever la cartouche de l'appareil d'extraction et la placer dans un courant d'air afin d'éliminer la majeure partie du solvant qui l'imprègne.

Deuxième extraction

Vider la cartouche dans le microbroyeur et broyer aussi finement que possible. Replacer quantitativement le mélange dans la cartouche et celle-ci dans l'appareil d'extraction.

Recommencer l'extraction pendant encore deux heures en utilisant le même ballon contenant la première extraction.

La solution obtenue dans le ballon d'extraction doit être limpide. À défaut, la filtrer sur un papier filtre en lavant plusieurs fois le premier ballon et le papier filtre avec de l'hexane. Recueillir le filtrat et le solvant de lavage dans un deuxième ballon préalablement séché et taré à 1 mg près.

Élimination du solvant et pesée de l'extrait

Chasser par distillation sur bain à chauffage électrique la majeure partie du solvant. Éliminer les dernières traces de solvant en chauffant le ballon à l'étuve à 103 °C ± 2 °C pendant 20 minutes. Faciliter cette élimination, soit en insufflant de l'air de temps à autre ou de préférence un gaz inerte, soit en opérant sous pression réduite.

Laisser refroidir le ballon dans un dessiccateur pendant au moins une heure , et le peser à 1 mg près.

Chauffer à nouveau 10 minutes dans les mêmes conditions, refroidir au dessiccateur et peser.

La différence entre les résultats de ces deux pesées doit être inférieure ou égale à 10 mg. Sinon, chauffer à nouveau pendant des périodes de dix minutes suivies du refroidissement et de la pesée, jusqu'à ce que la différence de masse soit au plus égale à 10 mg. Retenir la dernière pesée du ballon.

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon pour essai.

EXPRESSION DES RÉSULTATS

Mode de calcul et formule

a) L'extrait exprimé en pourcentage en masse du produit tel quel, est égal à :

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

où : S est le pourcentage en masse d'extrait du produit tel quel,

m_0 est la masse, en grammes, de la prise d'essai,

m_1 est la masse, en grammes, de l'extrait après séchage.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations, si les conditions de répétabilité sont remplies.

Exprimer le résultat avec une seule décimale.

b) L'extrait est rapporté à la matière sèche en utilisant la formule suivante :

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{extrait en \% gras/sec}$$

où :

S est le pourcentage en masse d'extrait du produit tel quel [voir sous a)],

U est sa teneur en eau et en matières volatiles.

Répétabilité

La différence entre les résultats des deux déterminations, effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas être supérieure à 0,2 g d'extrait à l'hexane pour 100 g d'échantillon.

Dans le cas contraire, répéter l'analyse sur deux autres prises d'essai. Si cette fois encore la différence dépasse 0,2 g, prendre comme résultat la moyenne arithmétique des quatre déterminations effectuées.