RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2019/1604 DE LA COMMISSION

du 27 septembre 2019

modifiant le règlement (CEE) nº 2568/91 relatif aux caractéristiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi qu'aux méthodes d'analyse y afférentes

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (UE) nº 1308/2013 du Parlement européen et du Conseil du 17 décembre 2013 portant organisation commune des marchés des produits agricoles et abrogeant les règlements (CEE) nº 922/72, (CEE) nº 234/79, (CE) nº 1037/2001 et (CE) nº 1234/2007 du Conseil [1], et notamment son article 91, premier alinéa, point d),

considérant ce qui suit:

(1) Le règlement (CEE) nº 2568/91 de la Commission [2] définit les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi que les méthodes d'évaluation de ces caractéristiques.

(2) Ces méthodes, ainsi que les valeurs limites relatives aux caractéristiques des huiles, sont actualisées régulièrement suivant l'avis d'experts chimistes et conformément aux travaux accomplis dans le cadre du Conseil oléicole international (ci-après le «COI»).

(3) Afin de garantir la mise en œuvre, dans l'Union, des normes internationales les plus récentes établies par le COI, il y a lieu de mettre à jour certaines méthodes d'analyse présentées dans le règlement (CEE) nº 2568/91.

(4) La norme commerciale du COI a été modifiée en ce qui concerne l'expression de la limite de l'acidité libre, l'indice de peroxyde, l'évaluation organoleptique (médiane du défaut et médiane de l'attribut fruité) et la différence entre ECN42 (CLHP) et ECN42 (calcul théorique), pour des raisons de cohérence avec les valeurs de précision de la méthode d'analyse.

(5) Conformément à l'article 2 *bis*, paragraphe 5, du règlement (CEE) nº 2568/91, les États membres sont tenus de vérifier si un échantillon d'huile d'olive est conforme à la catégorie déclarée en contrôlant les caractéristiques énumérées à l'annexe I dudit règlement, dans n'importe quel ordre ou dans l'ordre prévu par le schéma décisionnel figurant à l'annexe I *ter*.

(6) Étant donné les récentes évolutions, il y a lieu d'actualiser les tableaux de l'annexe I *ter* du règlement (CEE) nº 2568/91 et de son appendice, le cas échéant. Il apparaît également que le terme «diagramme» est plus adapté au contenu de ladite annexe que le terme «schéma décisionnel».

(7) Le point 9.4 de l'annexe XII du règlement (CEE) nº 2568/91 définit la médiane des défauts comme la médiane du défaut perçu avec la plus grande intensité. Dans le cadre des contre-analyses et étant donné que différents jurys doivent évaluer la conformité de l'huile, il y a lieu de préciser que la décision relative à la conformité des caractéristiques d'une huile avec la catégorie déclarée est uniquement liée à la valeur de la médiane du défaut principal, quelle que soit sa nature.

(8) Il y a lieu, dès lors, de modifier le règlement (CEE) nº 2568/91 en conséquence.

(9) Les mesures prévues par le présent règlement sont conformes à l'avis du comité de l'organisation commune des marchés agricoles,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Le règlement (CEE) nº 2568/91 est modifié comme suit:

1) l'article 2 est modifié comme suit:

a) au paragraphe 1, le point l) est remplacé par le texte suivant:

«l) pour la détermination de la composition stérolique et de la teneur en stérols et pour la détermination des composés alcooliques, par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, la méthode définie à l'annexe XIX»;

[1] JO L 347 du 20.12.2013, p. 671.
[2] Règlement (CEE) nº 2568/91 de la Commission du 11 juillet 1991 relatif aux caractéristiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi qu'aux méthodes d'analyse y afférentes (JO L 248 du 5.9.1991, p. 1).

b) au paragraphe 2, le troisième alinéa est remplacé par le texte suivant:

«Dans le cas où le jury ne confirme pas la catégorie déclarée en ce qui concerne les caractéristiques organoleptiques, les autorités nationales ou leurs représentants font procéder sans tarder, à la demande de l'intéressé, à deux contre-analyses par d'autres jurys agréés, dont au moins un est un jury agréé par l'État membre producteur concerné. Les caractéristiques en question sont considérées comme conformes à celles qui sont déclarées si les deux contre-analyses confirment le classement déclaré. Si tel n'est pas le cas, quel que soit le type des irrégularités constatées lors des contre-analyses, le classement est déclaré comme ne correspondant pas aux caractéristiques et les frais des contre-analyses sont à la charge de l'intéressé.»;

2) à l'article 2 *bis*, paragraphe 5, le point b) est remplacé par le texte suivant:

«b) dans l'ordre prévu par le diagramme figurant à l'annexe I *ter*, jusqu'à aboutir à l'une des décisions prévues par ledit diagramme.»;

3) le tableau «Sommaire des annexes» est remplacé par le tableau figurant à l'annexe I du présent règlement;

4) l'annexe I est remplacée par le texte de l'annexe II du présent règlement;

5) à l'annexe I *bis*, le point 2.1 est remplacé par le texte suivant:

«2.1. Chaque échantillon élémentaire doit être subdivisé en échantillons de laboratoire, conformément au point 2.5 de la norme EN ISO 5555, puis soumis à des analyses dans l'ordre indiqué par le diagramme figurant à l'annexe I *ter* ou dans un ordre aléatoire.»;

6) l'annexe I *ter* est remplacée par le texte de l'annexe III du présent règlement;

7) l'annexe V est supprimée;

8) à l'annexe VII, le point 4.2 est remplacé par le texte suivant:

«4.2. n-hexane (pour chromatographie). L'hexane peut être remplacé par de l'iso-octane (2,2,4-triméthylpentane dans la chromatographie), à condition que des valeurs de précision comparables puissent être obtenues.»;

9) l'annexe XII est modifiée conformément à l'annexe IV du présent règlement;

10) l'annexe XVII est modifiée conformément à l'annexe V du présent règlement;

11) l'annexe XVIII est modifiée conformément à l'annexe VI du présent règlement;

12) l'annexe XIX est remplacée par le texte de l'annexe VII du présent règlement;

13) à l'annexe XX, le point 4.2 est remplacé par le texte suivant:

«4.2. n-hexane, pour chromatographie ou analyse de résidus. L'hexane peut être remplacé par de l'iso-octane (2,2,4-triméthylpentane dans la chromatographie), à condition que des valeurs de précision comparables puissent être obtenues. Les solvants dont la température d'ébullition est plus élevée que celle du n-hexane ont un temps d'évaporation plus long. Ils sont toutefois préférables en raison de la toxicité de l'hexane. La pureté doit être vérifiée; par exemple, le résidu après l'évaporation de 100 ml de solvant peut être contrôlé.

AVERTISSEMENT: risques d'inflammation des vapeurs. Tenir à l'écart des 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 inflammable. 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.

L'iso-octane est un liquide inflammable qui présente un risque d'incendie. Les limites d'explosivité dans l'air sont 1,1 % et 6 % (fraction volumique). Il est toxique en cas d'ingestion et d'inhalation. Utiliser une hotte de ventilation en bon état de fonctionnement pour travailler avec ce solvant.»

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

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

Fait à Bruxelles, le 27 septembre 2019.

Par la Commission

Le président

Jean-Claude JUNCKER

ANNEXE I

«*ANNEXES*

SOMMAIRE

Annexe I	Caractéristiques des huiles d'olive
Annexe I *bis*	Échantillonnage des huiles d'olive ou des huiles de grignons d'olive livrées en conditionnement primaire
Annexe I *ter*	Diagramme des procédures de vérification de la conformité d'un échantillon d'huile d'olive avec la catégorie déclarée
Annexe II	Détermination des acides gras libres, méthode à froid
Annexe III	Détermination de l'indice de peroxyde
Annexe IV	Détermination de la teneur en cires par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire
Annexe VII	Détermination du pourcentage de 2-glycéryl monopalmitate
Annexe IX	Analyse spectrophotométrique dans l'ultraviolet
Annexe X	Détermination des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse
Annexe XI	Détermination de la teneur en solvants halogénés volatils de l'huile d'olive
Annexe XII	Méthode du conseil oléicole international pour l'évaluation organoleptique des huiles d'olive vierges
Annexe XV	Teneur en huile des grignons d'olive
Annexe XVI	Détermination de l'indice d'iode
Annexe XVII	Méthode de détermination des stigmastadiènes dans les huiles végétales
Annexe XVIII	Détermination de l'écart entre la teneur réelle et la teneur théorique en triglycérides à ECN 42
Annexe XIX	Détermination de la composition stérolique, et de la teneur en stérols et de la teneur en composés alcooliques par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire
Annexe XX	Méthode de détermination de la teneur en cires, en esters méthyliques d'acides gras et en esters éthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire
Annexe XXI	Résultats des contrôles de conformité réalisés sur les huiles d'olive visés à l'article 8, paragraphe 2»

ANNEXE II

«*ANNEXE I*

CARACTÉRISTIQUES DES HUILES D'OLIVE

Caractéristiques de qualité

Catégorie	Acidité (%) (*)	Indice de peroxyde (mEq O_2/kg)	K_{232}	K_{268} ou K_{270}	Delta-K	Évaluation organoleptique		Esters éthyliques d'acides gras (mg/kg)
						Médiane du défaut (Md) (*)	Médiane du fruité (Mf)	
1. Huile d'olive vierge extra	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Huile d'olive vierge	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Huile d'olive lampante	> 2,0	—	—	—	—	Md> 3,5 (1)	—	—
4. Huile d'olive raffinée	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Huile d'olive composée d'huiles d'olive raffinées et d'huiles d'olive vierges	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Huile de grignons d'olive brute	—	—	—	—	—		—	—
7. Huile de grignons d'olive raffinée	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Huile de grignons d'olive	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(1) La médiane du défaut peut être inférieure ou égale à 3,5 lorsque la médiane du fruité est égale à 0,0.

Caractéristiques de pureté

Catégorie	Composition en acides gras (1)						Somme des isomères transoléiques (%)	Somme des isomères translinoléiques + translinoléniques (%)	Stigmastadiènes (mg/kg) (2)	Écart: ECN42 (CLHP) et ECN42 (calcul théorique)	2-glycéril monopalmitate (%)
	Myristique (%)	Linolénique (%)	Arachidique (%)	Eicosénoïque (%)	Béhénique (%)	Lignocérique (%)					
1. Huile d'olive vierge extra	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9 si acide palmitique total en % ≤ 14,00 % ≤ 1,0 si acide palmitique total en % > 14,00 %
2. Huile d'olive vierge	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9 si acide palmitique total en % ≤ 14,00 % ≤ 1,0 si acide palmitique total en % > 14,00 %
3. Huile d'olive lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9 si acide palmitique total en % ≤ 14,00 % ≤ 1,1 si acide palmitique total en % > 14,00 %
4. Huile d'olive raffinée	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9 si acide palmitique total en % ≤ 14,00 % ≤ 1,1 si acide palmitique total en % > 14,00 %
5. Huile d'olive composée d'huiles d'olive raffinées et d'huiles d'olive vierges	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9 si acide palmitique total en % ≤ 14,00 % ≤ 1,0 si acide palmitique total en % > 14,00 %
6. Huile de grignons d'olive brute	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Huile de grignons d'olive raffinée	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Huile de grignons d'olive	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

(1) Teneur en autres acides gras (%): palmitique: 7,50-20,00; palmitoléique: 0,30-3,50; heptadécanoïque: ≤ 0,40; heptadécénoïque ≤ 0,60; stéarique: 0,50-5,00; oléique: 55,00-83,00; linoléique: 2,50-21,00.

(2) Sommes des isomères qui pourraient (ou ne pourraient pas) être séparés par colonne capillaire.

Catégorie	Composition en stérols						Stérols totaux (mg/kg)	Érythrodiol et uvaol (%) (*)	Cires mg/kg (**)
	Cholestérol (%)	Brassicastérol (%)	Campestérol (1) (%)	Stigmastérol (%)	β-sitostérol apparent (2) (%)	Delta-7-stigmasténol (1) (%)			
1. Huile d'olive vierge extra	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Huile d'olive vierge	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Huile d'olive lampante	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (3)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ (3)
4. Huile d'olive raffinée	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Huile d'olive composée d'huiles d'olive raffinées et d'huiles d'olive vierges	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Huile de grignons d'olive brute	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (4)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ (4)
7. Huile de grignons d'olive raffinée	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Huile de grignons d'olive	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

(1) Voir l'appendice de la présente annexe.

(2) β-sitostérol app.: delta-5,23-stigmastadiénol+clérostérol+bêta-sitostérol+sitostanol+delta-5-avenastérol+delta-5,24-stigmastadiénol.

(3) Les huiles ayant une teneur en cires comprise entre 300 mg/kg et 350 mg/kg sont considérées comme des huiles d'olive lampantes si leur teneur totale en alcools aliphatiques est inférieure ou égale à 350 mg/kg, ou si leur teneur en érythrodiol et en uvaol est inférieure ou égale à 3,5 %.

(4) Les huiles ayant une teneur en cires comprise entre 300 mg/kg et 350 mg/kg sont considérées comme des huiles de grignons d'olive brutes si leur teneur totale en alcools aliphatiques est supérieure à 350 mg/kg et si leur teneur en érythrodiol et en uvaol est supérieure à 3,5 %.

Remarques:

a) Les résultats des analyses doivent être exprimés en indiquant le même nombre de décimales que ceux prévus pour chaque caractéristique. Le dernier chiffre doit être augmenté d'une unité si le chiffre suivant dépasse 4.

b) Il suffit qu'une seule caractéristique ne corresponde pas aux valeurs indiquées pour que l'huile change de catégorie ou soit déclarée non conforme aux fins du présent règlement.

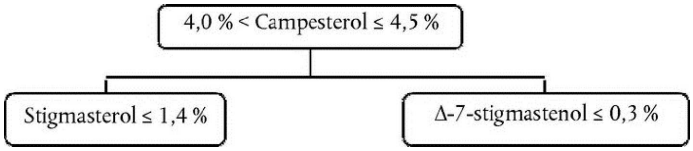
c) Pour l'huile d'olive lampante, les deux caractéristiques de qualité marquées d'un astérisque (*) peuvent différer simultanément des limites définies pour cette catégorie.

d) Les caractéristiques marquées de deux astérisques (**) indiquent, pour l'huile de grignons d'olive brute, qu'il est possible que les deux limites applicables diffèrent simultanément des valeurs indiquées. Pour l'huile de grignons d'olive et l'huile de grignons d'olive raffinée, l'une des limites applicables peut différer des valeurs indiquées.

Appendice

Schémas décisionnels

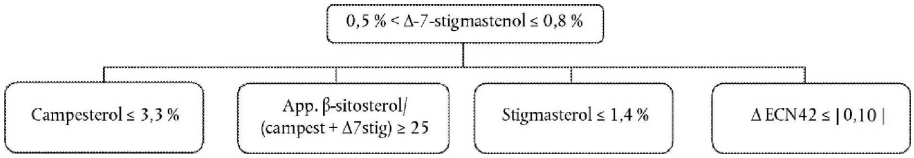
Schéma décisionnel relatif au **campestérol** pour les huiles d'olive vierges et les huiles d'olive vierges extra:



Les autres paramètres sont conformes aux limites définies dans le présent règlement.

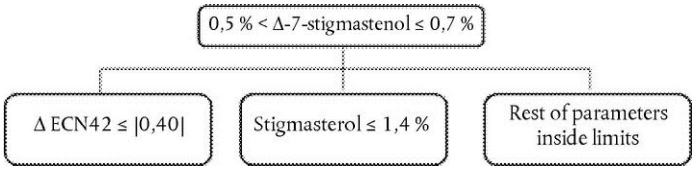
Schéma décisionnel relatif au **delta-7-stigmasténol** pour:

— les huiles d'olive vierges et les huiles d'olive vierges extra



Les autres paramètres sont conformes aux limites définies dans le présent règlement.

— les huiles de grignons d'olive (brutes et raffinées)



Les autres paramètres sont conformes aux limites définies dans le présent règlement.»

ANNEXE III

«ANNEXE I ter

DIAGRAMME DES PROCÉDURES DE VÉRIFICATION DE LA CONFORMITÉ D'UN ÉCHANTILLON D'HUILE D'OLIVE AVEC LA CATÉGORIE DÉCLARÉE

Tableau général

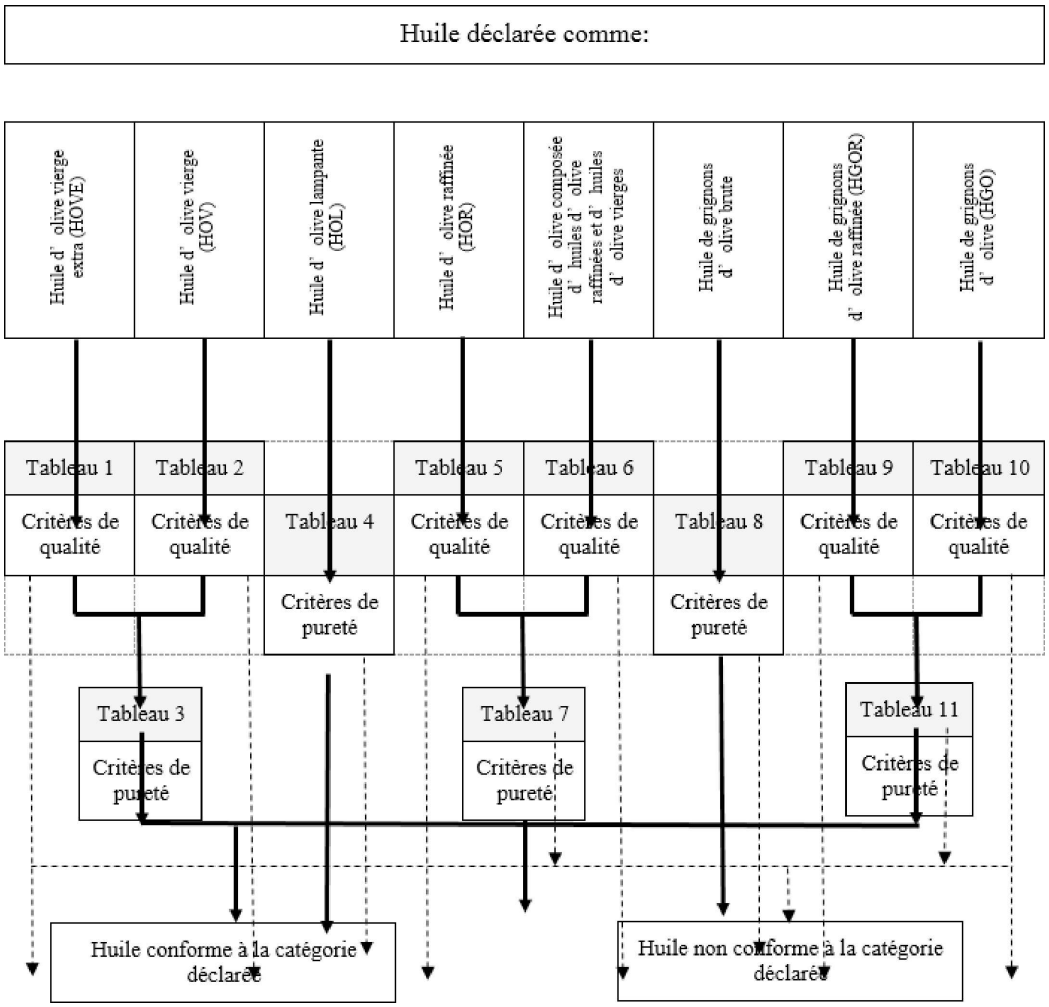


Tableau 1 — Huile d'olive vierge extra — Critères de qualité

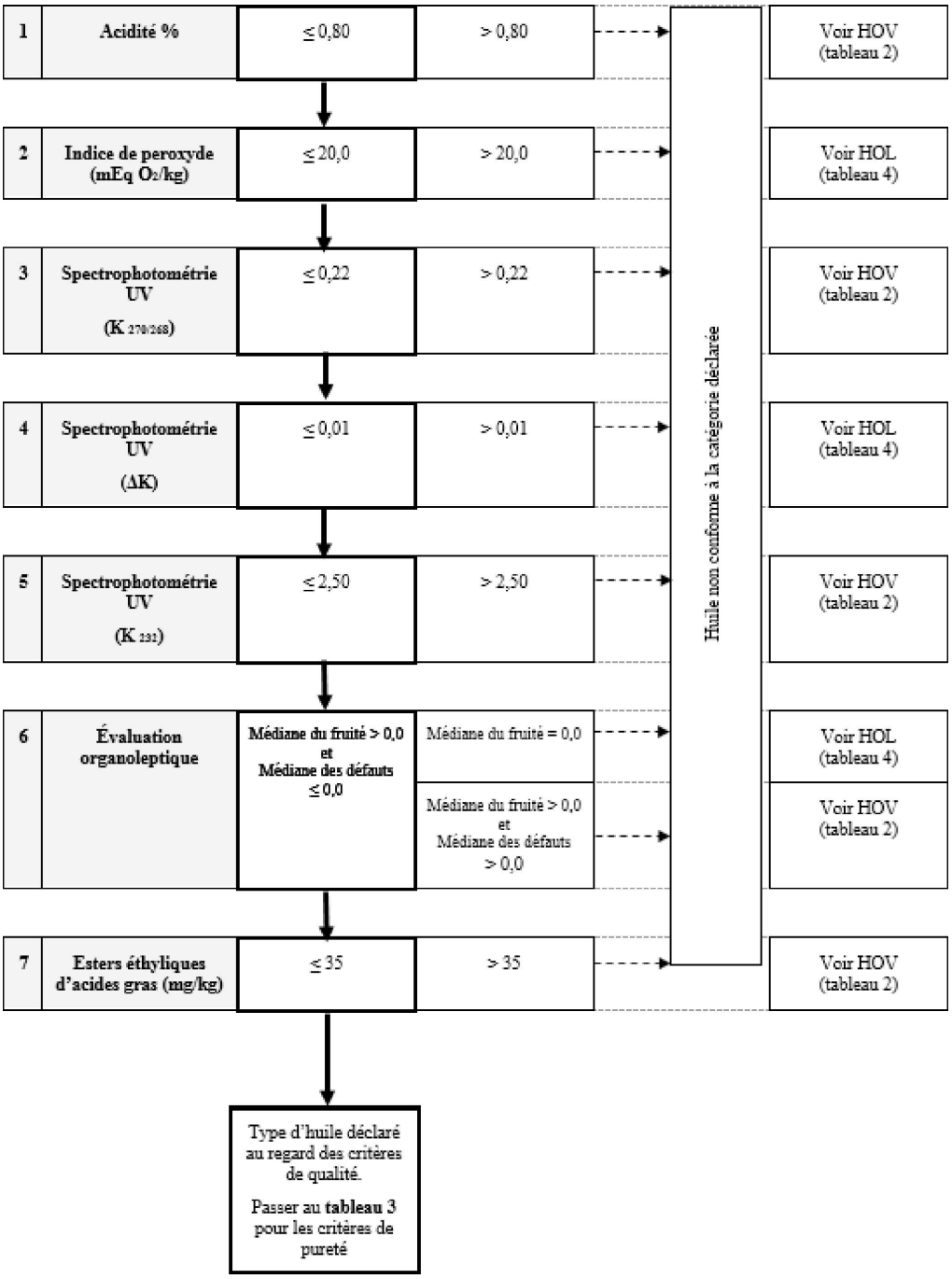


Tableau 2 – Huile d'olive vierge – Critères de qualité

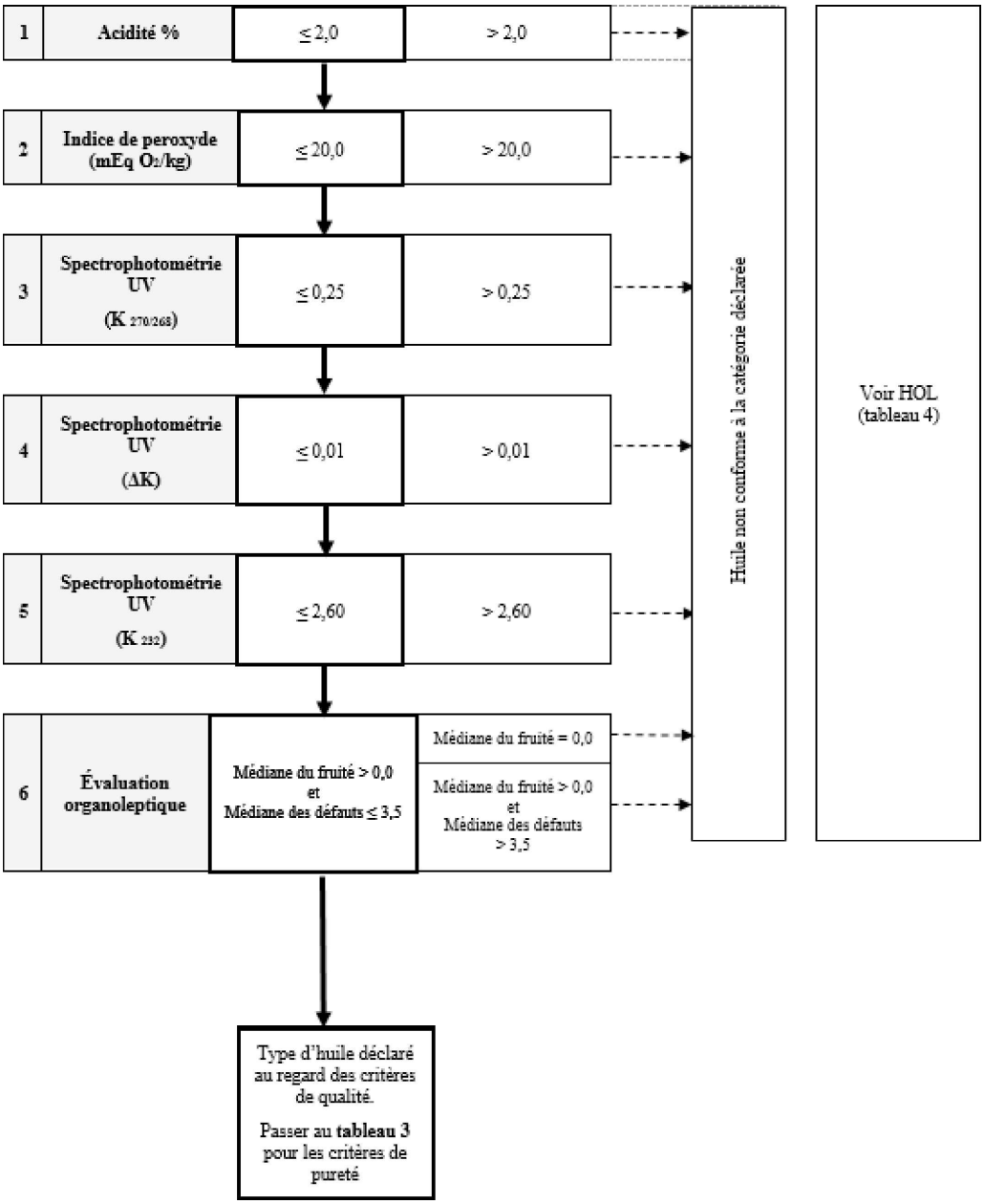


Tableau 3 — Huile d'olive vierge extra et huile d'olive vierge — Critères de pureté

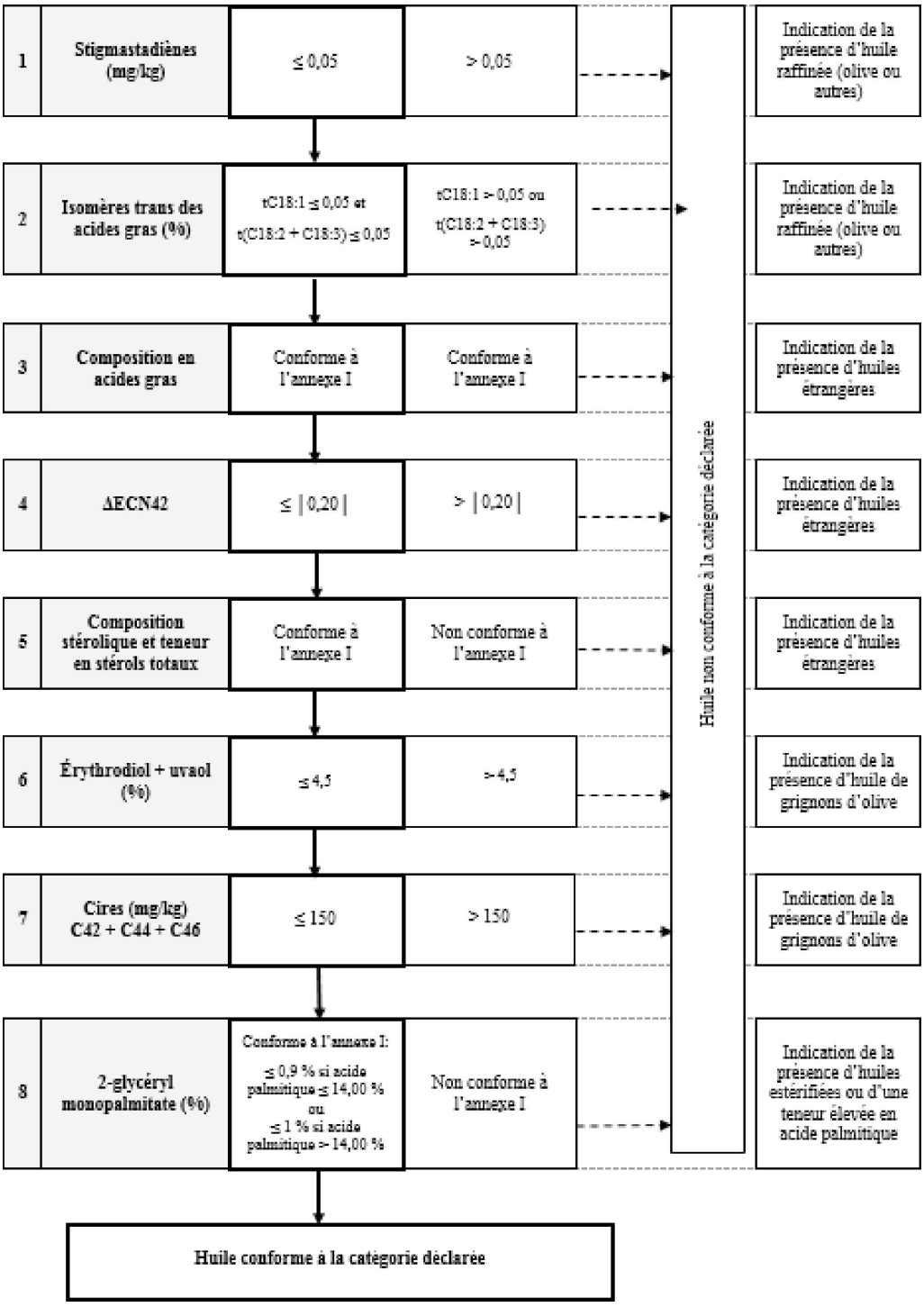


Tableau 4 – Huile d'olive lampante – Critères de pureté

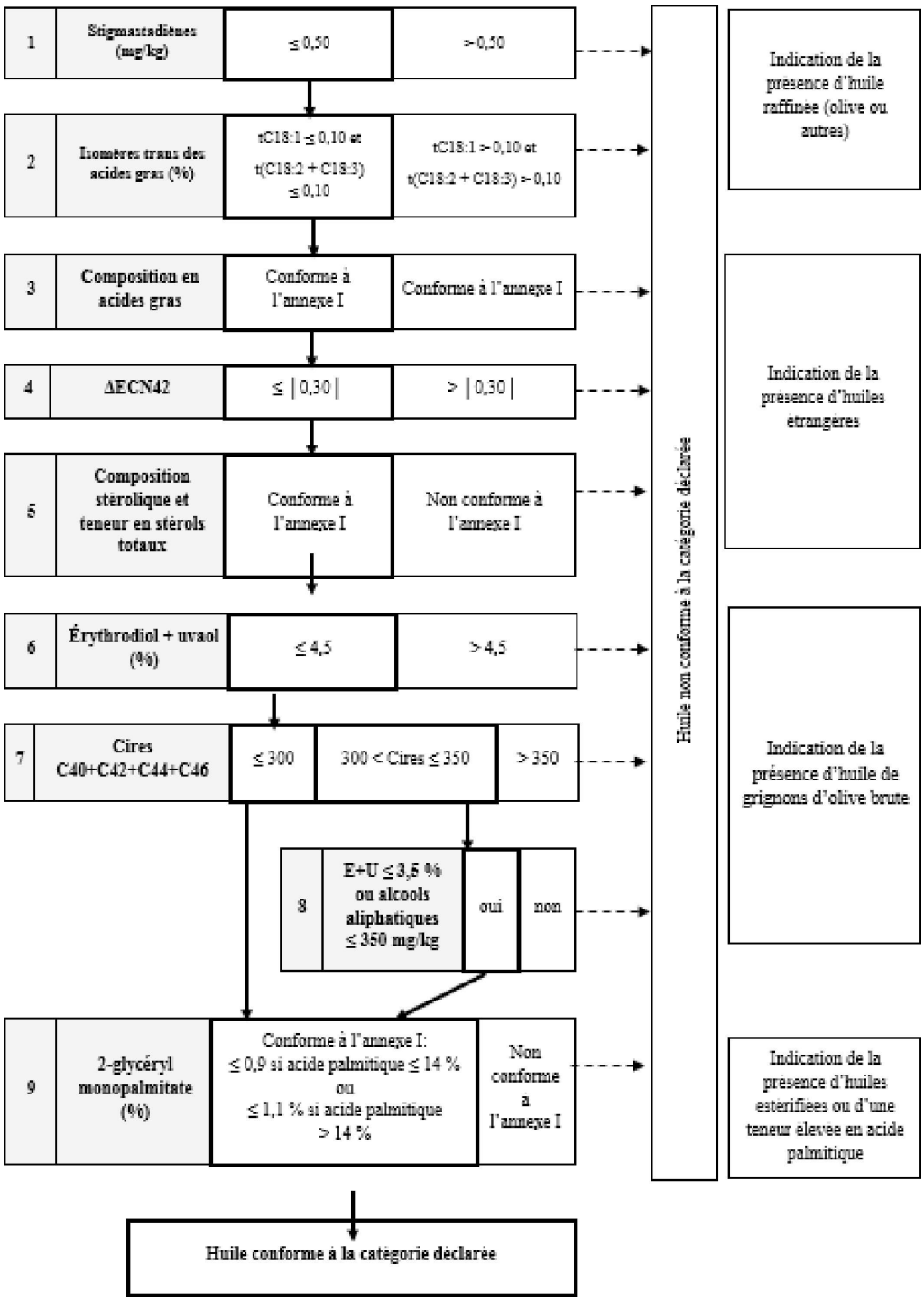


Tableau 5 – Huile d'olive raffinée – Critères de qualité

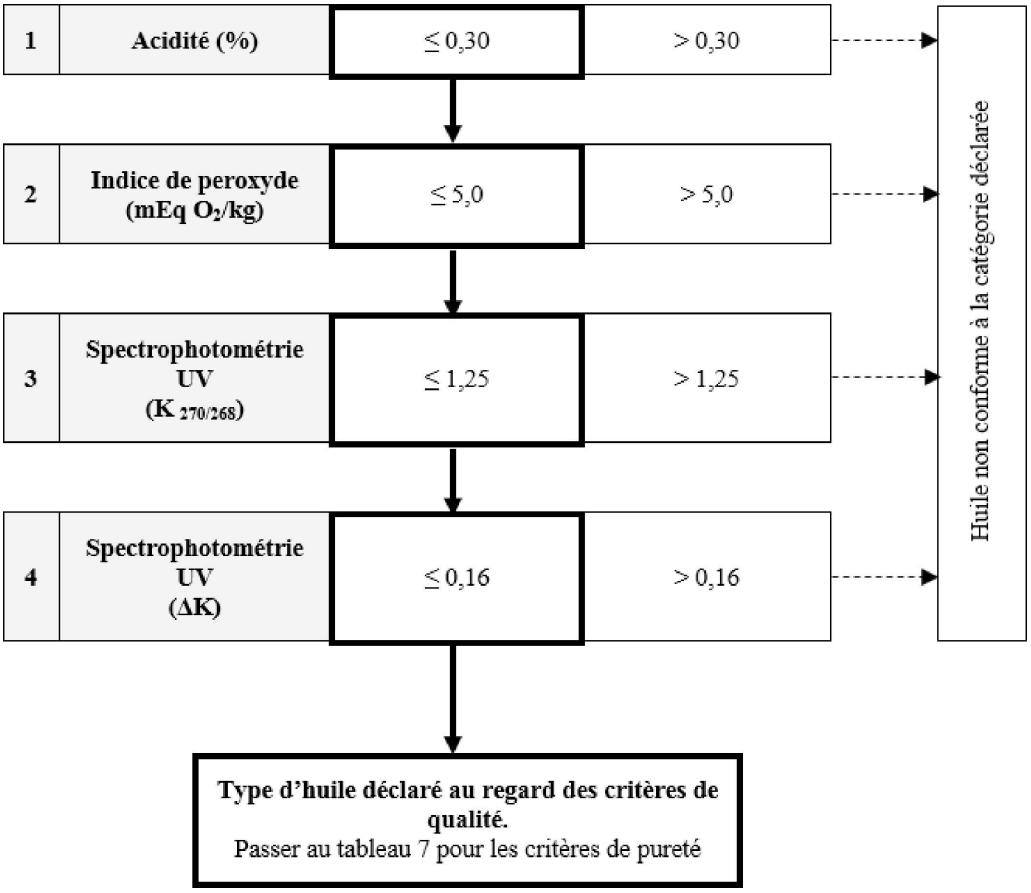


Tableau 6 – Huile d'olive (constituée d'huiles d'olive raffinées et d'huiles d'olive vierges) – critères de qualité

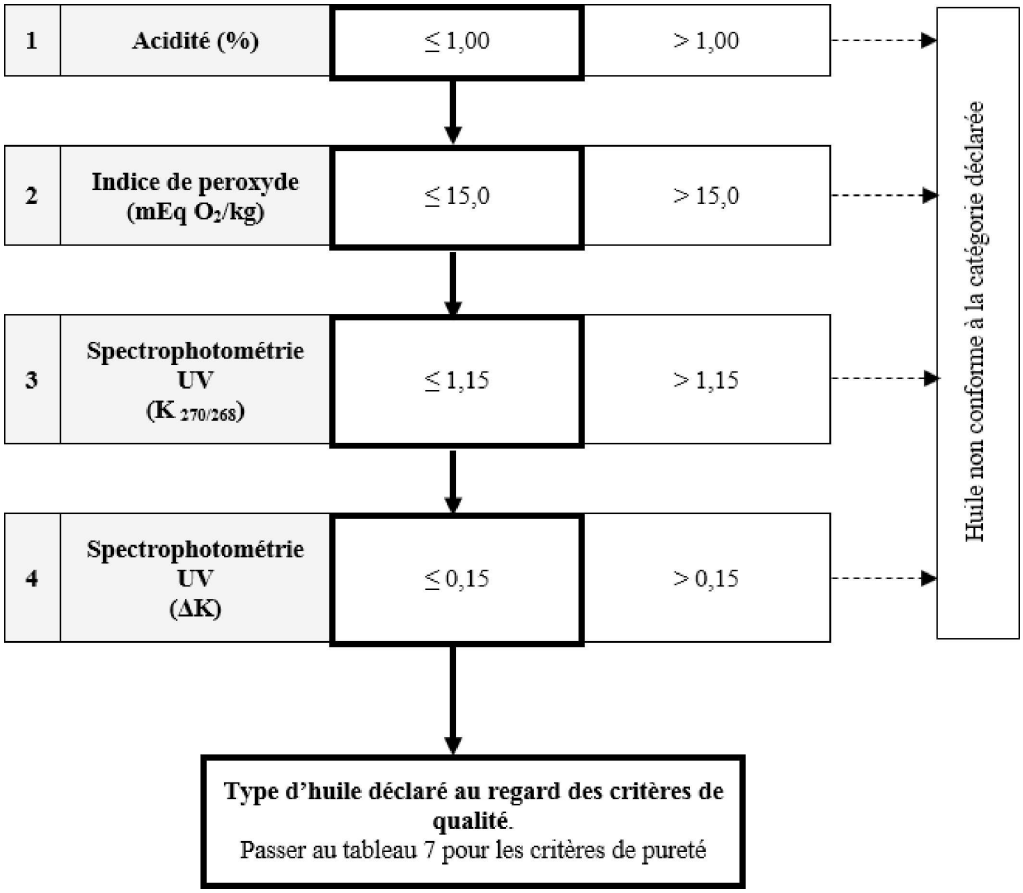


Tableau 7 – Huile d'olive raffinée et huile d'olive constituée d'huiles d'olive raffinées et d'huiles d'olive vierges – critères de pureté

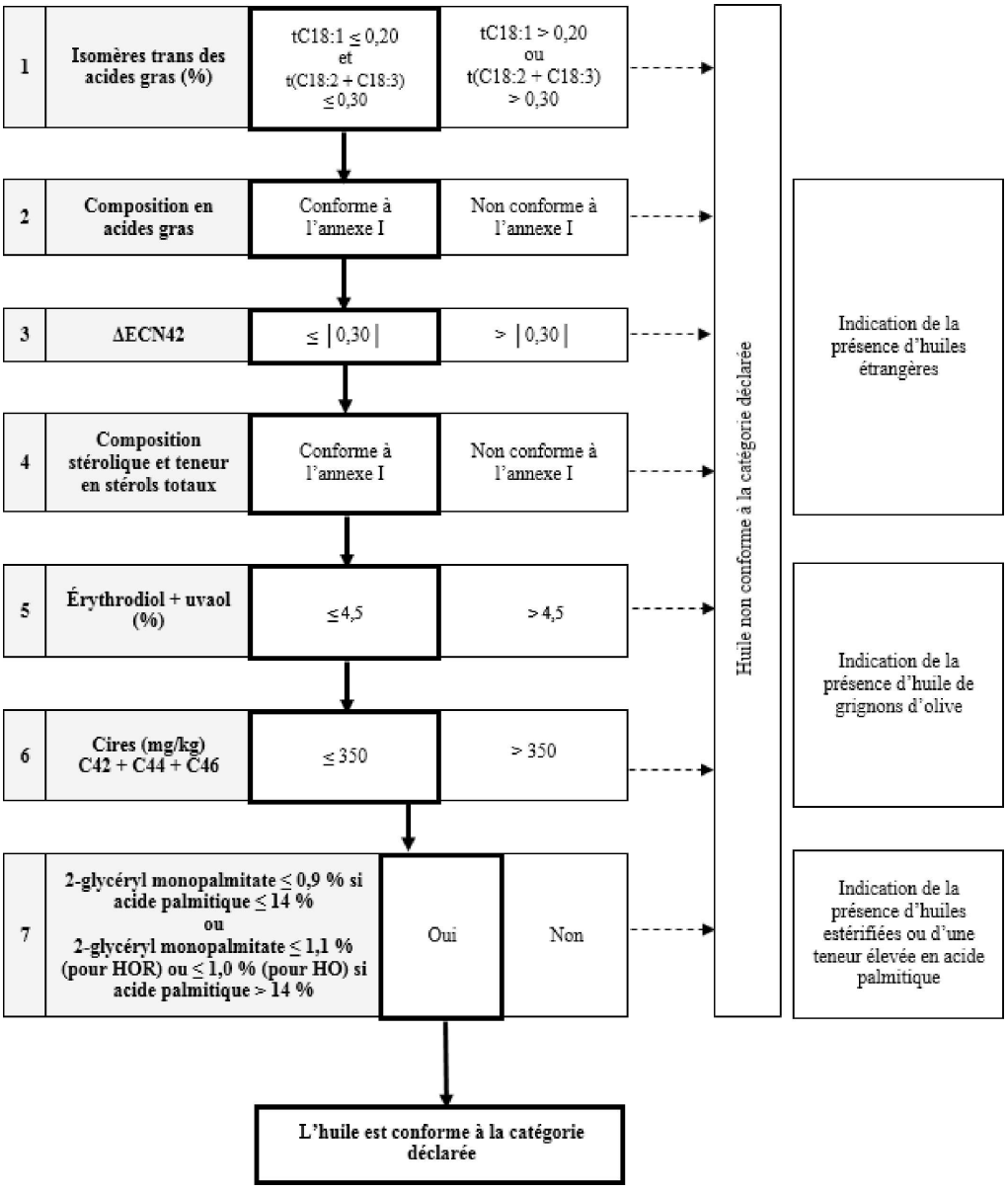


Tableau 8 – Huile de grignons d'olive brute – Critères de pureté

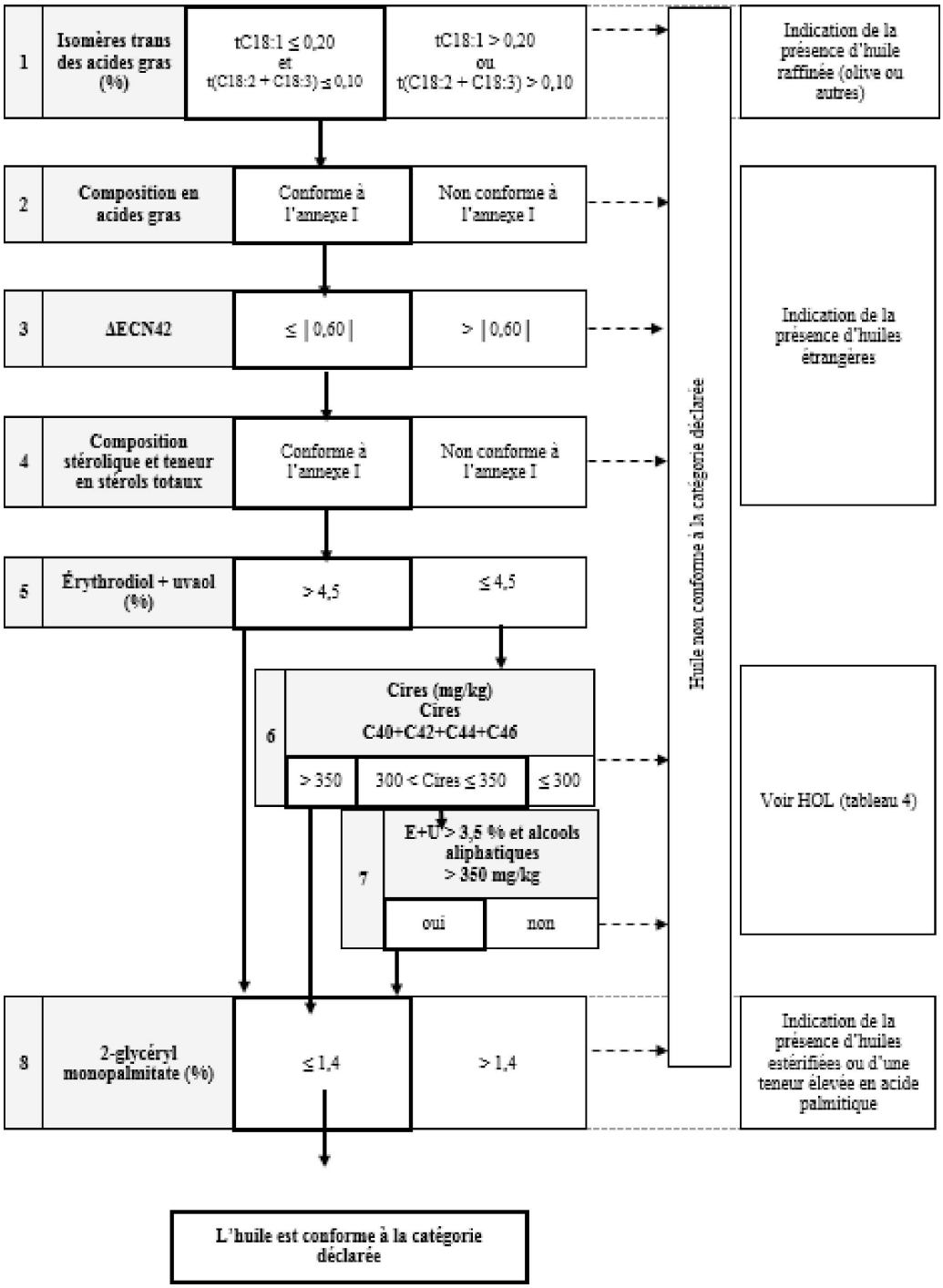


Tableau 9 – Huile de grignons d'olive raffinée – Critères de qualité

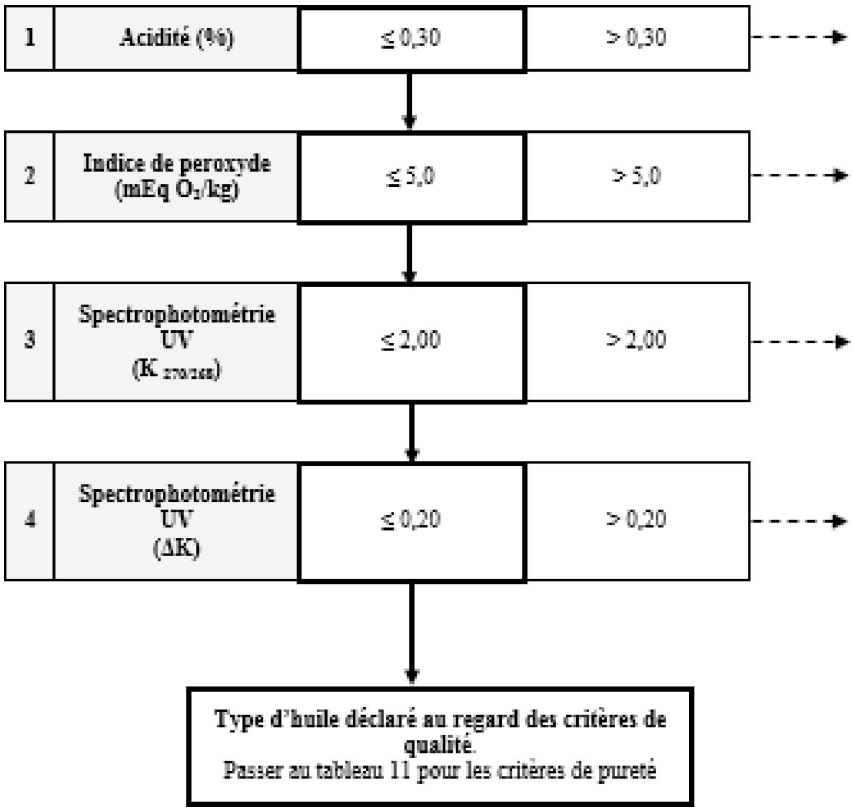


Tableau 10 – Huile de grignons d'olive – Critères de qualité

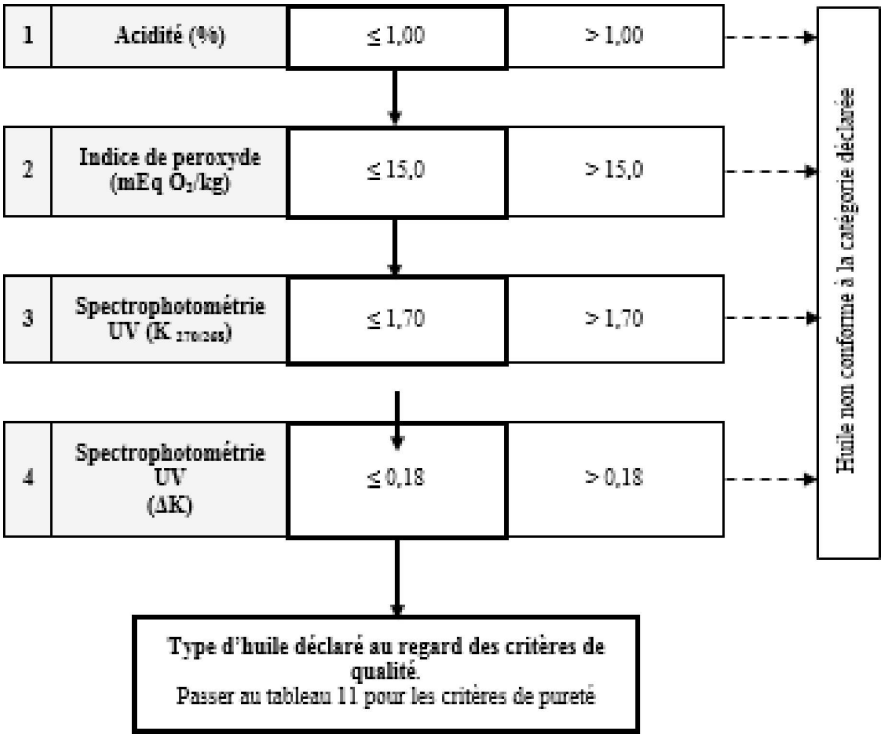
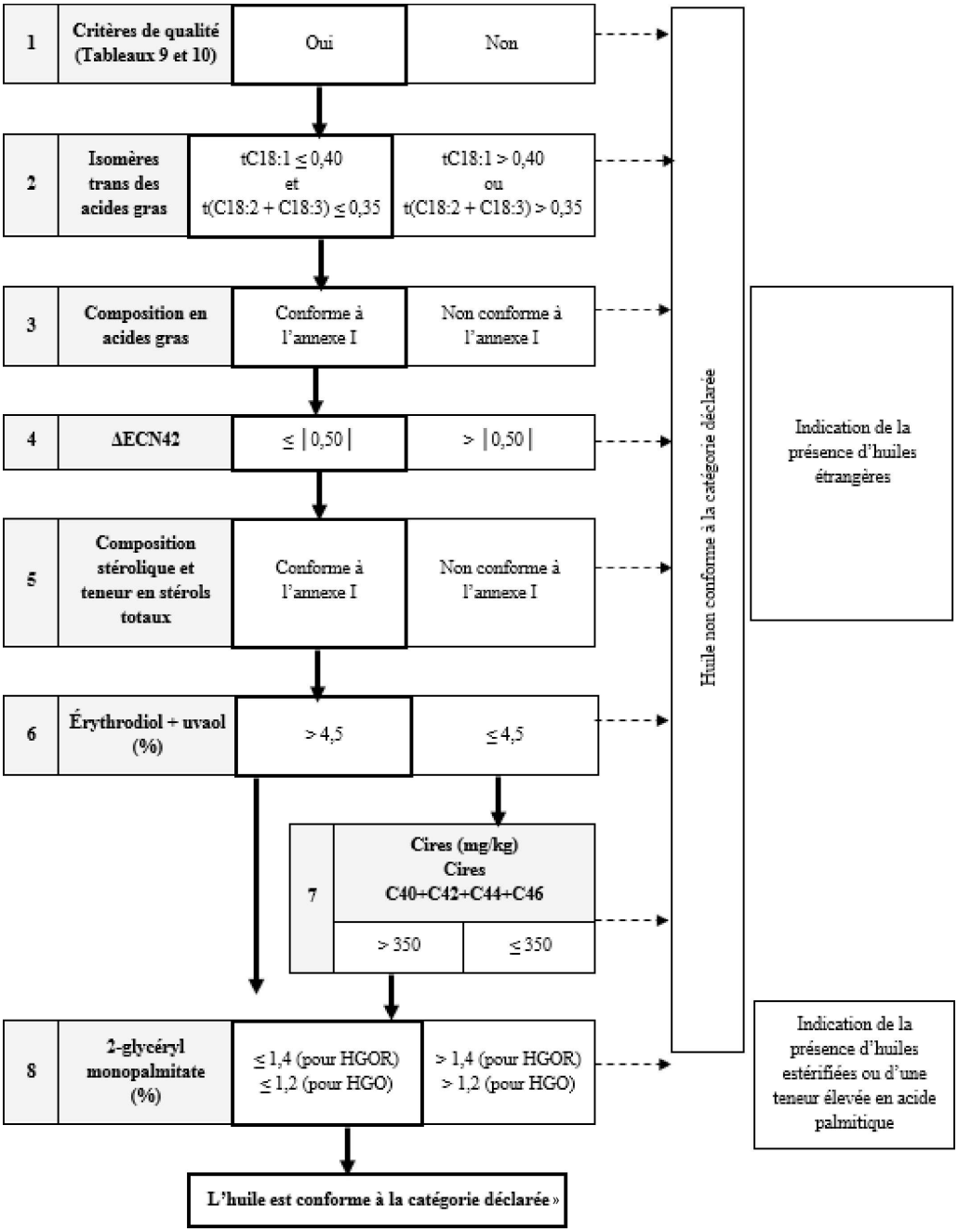


Tableau 11 — Huile de grignons d'olive raffinée et huile de grignons d'olive — Critères de pureté



ANNEXE IV

L'annexe XII est modifiée comme suit:

1) le point 3.3 est remplacé par le texte suivant:

«3.3. **Terminologie facultative aux fins de l'étiquetage**

Sur demande, le chef de jury peut certifier que les huiles qui ont été évaluées répondent aux définitions et aux palettes de sensation correspondant uniquement aux adjectifs ci-après, en fonction de l'intensité et de la perception des attributs:

Attributs positifs (fruité, amer et piquant): en fonction de l'intensité de la perception:

— *intense*, lorsque la médiane de l'attribut est supérieure à 6,0,

— *moyen*, lorsque la médiane de l'attribut est supérieure à 3,0 et inférieure ou égale à 6,0,

— *léger*, lorsque la médiane de l'attribut est inférieure ou égale à 3,0.

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

Fruité vert Ensemble des sensations olfactives caractéristiques de l'huile rappelant les fruits verts, dépendant de la variété des olives, provenant de fruits verts, sains et frais, et perçues par voie directe et/ou rétronasale.

Fruité mûr Ensemble des sensations olfactives caractéristiques de l'huile rappelant les fruits mûrs, dépendant de la variété des olives, provenant de fruits sains et frais, et perçues par voie directe et/ou rétronasale.

Équilibré Huile qui n'est pas déséquilibrée. On entend par «déséquilibre» la sensation olfactogustative et tactile de l'huile dans laquelle la médiane de l'attribut amer ou la médiane de l'attribut piquant est supérieure de 2,0 points à la médiane du fruité.

Huile douce Huile pour laquelle la médiane des attributs amer et piquant est inférieure ou égale à 2,0.

Liste des termes décrivant l'intensité de la perception:

Termes subordonnés à la présentation d'un certificat d'essai organoleptique	Médiane de l'attribut
Fruité	—
Fruité mûr	—
Fruité vert	—
Fruité léger	≤ 3,0
Fruité moyen	3,0 < Me ≤ 6,0
Fruité intense	> 6,0
Fruité mûr léger	≤ 3,0
Fruité mûr moyen	3,0 < Me ≤ 6,0
Fruité mûr intense	> 6,0
Fruité vert léger	≤ 3,0
Fruité vert moyen	3,0 < Me ≤ 6,0
Fruité vert intense	> 6,0

Termes subordonnés à la présentation d'un certificat d'essai organoleptique	Médiane de l'attribut
Amer léger	≤ 3,0
Amer moyen	3,0 < Me ≤ 6,0
Amer intense	> 6,0
Piquant léger	≤ 3,0
Piquant moyen	3,0 < Me ≤ 6,0
Piquant intense	> 6,0
Huile équilibrée	La médiane de l'attribut amer et la médiane de l'attribut piquant ne dépassent pas de plus de 2,0 points la médiane du fruité.
Huile douce	La médiane de l'attribut amer et la médiane de l'attribut piquant sont inférieures ou égales à 2,0.»

2) le point 9.4. est remplacé par le texte suivant:

«9.4. **Classement de l'huile**

L'huile est classée dans les catégories ci-après, en fonction de la médiane des défauts et de la médiane de l'attribut fruité. La médiane des défauts est définie comme la médiane du défaut perçu avec la plus grande intensité. La médiane des défauts et la médiane de l'attribut fruité sont exprimées avec une seule décimale.

Le classement de l'huile est effectué par comparaison de la valeur de la médiane des défauts et de la médiane du fruité avec les plages de référence indiquées ci-après. Les limites de ces plages ayant été établies en tenant compte de l'erreur de la méthode, elles sont considérées comme absolues. Les logiciels informatiques permettent de visualiser le classement sous la forme d'un tableau de données statistiques ou d'un graphique.

a) Huile d'olive vierge extra: la médiane des défauts est égale à 0,0 et la médiane du fruité est supérieure à 0,0;

b) Huile d'olive vierge: la médiane des défauts est supérieure à 0,0 mais ne dépasse pas 3,5, et la médiane du fruité est supérieure à 0,0;

c) Huile d'olive vierge lampante: la médiane des défauts est supérieure à 3,5, ou la médiane des défauts est inférieure ou égale à 3,5 et la médiane du fruité est égale à 0,0.

Remarque 1: lorsque la médiane de l'attribut amer et/ou piquant est supérieure à 5,0, le chef de jury le précise sur le certificat d'analyse.

Dans le cas des analyses effectuées dans le cadre de contrôles de conformité, un essai est réalisé. Dans le cas d'analyses contradictoires, l'analyse doit être effectuée en double au cours de séances distinctes. Les résultats de la contre-analyse doivent être statistiquement homogènes. (Voir point 9.5.) Si tel n'est pas le cas, l'échantillon doit à nouveau être analysé deux fois. La valeur finale de la médiane des attributs de classement est calculée sur la base de la moyenne des deux médianes.»

ANNEXE V

L'annexe XVII est modifiée comme suit:

1) le point 5.1. est remplacé par le texte suivant:

«5.1. Hexane ou mélange d'alcanes dont les températures d'ébullition sont comprises entre 65 et 70 °C, distillés à l'aide d'une colonne de fractionnement. L'hexane peut être remplacé par de l'iso-octane (2,2,4-triméthylpentane dans la chromatographie), à condition que des valeurs de précision comparables puissent être obtenues. Le résidu après l'évaporation de 100 ml de solvant peut être contrôlé. Les solvants dont le point d'ébullition est supérieur à celui du n-hexane ont un temps d'évaporation plus long. Ils sont toutefois préférables en raison de la toxicité de l'hexane.»;

2) au point 6.3.3, le texte suivant est ajouté:

«Remarque 10. Lorsque les concentrations en stigmastadiènes sont supérieures à 4 mg/kg et qu'elles doivent être quantifiées, la méthode du Conseil oléicole international pour la détermination des stérènes dans les huiles raffinées est obligatoirement appliquée.»

ANNEXE VI

L'annexe XVIII est modifiée comme suit:

1) le point 4.2.1 est remplacé par le point suivant:

«4.2.1. Éther de pétrole 40-60 °C pour chromatographie ou hexane. L'hexane peut être remplacé par de l'iso-octane (2,2,4-triméthylpentane dans la chromatographie), à condition que des valeurs de précision comparables puissent être obtenues. Les solvants dont le point d'ébullition est supérieur à celui du n-hexane ont un temps d'évaporation plus long. Ils sont toutefois préférables en raison de la toxicité de l'hexane.»;

2) il est ajouté un point 4.2.12 libellé comme suit:

«4.2.12. Heptane pour chromatographie. L'heptane peut être remplacé par de l'iso-octane (2,2,4-triméthylpentane dans la chromatographie).»

ANNEXE VII

«ANNEXE XIX

DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION STÉROLIQUE, DE LA TENEUR EN STÉROLS ET DE LA TENEUR EN COMPOSÉS ALCOOLIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE

1. CHAMP D'APPLICATION

La méthode décrit le procédé de détermination de la teneur en chaque composé alcoolique et en composés alcooliques totaux des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi que des mélanges de ces deux huiles.

Les composés alcooliques présents dans les huiles d'olive et huiles de grignons d'olive comprennent des alcools aliphatiques, des stérols et des diols triterpéniques.

2. PRINCIPE

Saponification des huiles, additionnées d'α-cholestanol et de 1-eicosanol comme étalons internes, avec de l'hydroxyde de potassium en solution dans de l'éthanol, puis extraction de l'insaponifiable au moyen d'éther éthylique.

Les différentes fractions des composés alcooliques sont séparées de l'insaponifiable soit par chromatographie en couche mince sur plaque de gel de silice basique (méthode de référence), soit par CLHP sur colonne de gel de silice. La fraction issue de la séparation sur gel de silice est transformée en triméthyl-silyl-éthers, qui sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

PARTIE 1

PRÉPARATION DE L'INSAPONIFIABLE

1. CHAMP D'APPLICATION

La présente partie décrit la préparation et l'extraction de l'insaponifiable. Elle comprend la préparation et l'extraction de l'insaponifiable des huiles d'olive et huiles de grignons d'olive.

2. PRINCIPE

Une prise d'essai est saponifiée par ébullition sous reflux avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium. L'insaponifiable est extrait avec de l'éther diéthylique.

3. APPAREILLAGE

Le matériel courant de laboratoire, et notamment les éléments suivants:

3.1. ballon de 250 ml équipé d'un réfrigérant à reflux à embouts rodés,

3.2. ampoule à décanter de 500 ml,

3.3. flacons de 250 ml,

3.4. microseringues de 100 µl et 500 µl,

3.5. ampoule cylindrique filtrante à filtre poreux G 3 (porosité 15 à 40 µm) d'environ 2 cm de diamètre et 5 cm de hauteur, appropriée pour la filtration sous vide, avec embout rodé mâle,

3.6. fiole conique de 50 ml avec embout rodé femelle adaptable à l'ampoule filtrante (3.5),

3.7. tube à fond conique de 10 ml, avec bouchon hermétique en verre,

3.8. dessiccateur au dichlorure de calcium.

4. RÉACTIFS

4.1. Hydroxyde de potassium (titre minimum 85 %).

4.2. Hydroxyde de potassium en solution éthanolique à environ 2 M.

Dissoudre, tout en refroidissant, 130 g d'hydroxyde de potassium (4.1) dans 200 ml d'eau distillée, puis compléter jusqu'à un litre avec de l'éthanol (4.7). Conserver cette solution dans des bouteilles en verre sombre bien fermées pendant 2 jours au maximum.

4.3. Éther éthylique pour analyses.

4.4. Sulfate de sodium anhydre pour analyses.

4.5. Acétone pour chromatographie.

4.6. Éther éthylique pour chromatographie.

4.7. Éthanol pour analyses.

4.8. Acétate d'éthyle pour analyses.

4.9. Étalon interne, α-cholestanol, de pureté supérieure à 99 % (la pureté doit être vérifiée par analyse chromatographique en phase gazeuse).

4.10. Solution étalon interne d'α-cholestanol à 0,2 % (m/V) dans de l'acétate d'éthyle (4.8).

4.11. Solution de phénolphtaléine, 10 g/l dans de l'éthanol (4.7).

4.12. Solution de 1-eicosanol à 0,1 % (m/V) dans de l'acétate d'éthyle (étalon interne).

5. MODE OPÉRATOIRE

À l'aide d'une microseringue de 500 µl (3.4), introduire dans le ballon de 250 ml (point 3.1) un volume de la solution étalon interne d'α-cholestanol (4.10) et un volume de la solution de 1-eicosanol (4.12) contenant une quantité de cholestanol et d'eicosanol correspondant approximativement à 10 % de la teneur en stérols et en alcools de l'échantillon. Par exemple, pour 5 g d'échantillon d'huile d'olive, ajouter 500 µl de la solution d'α-cholestanol (4.10) et 250 µl de la solution de 1-eicosanol (4.12). Pour les huiles de grignons d'olive, ajouter 1 500 µl de solution d'α-cholestanol (4.10) et de 1-eicosanol (4.12). Laisser évaporer complètement sous un léger courant d'azote dans un bain d'eau tiède. Après refroidissement du ballon, peser 5,00 ± 0,01 g d'échantillon filtré et sec dans le même ballon.

Remarque 1: les huiles et les graisses animales ou végétales contenant de grandes quantités de cholestérol peuvent présenter un pic dont le temps de rétention est identique à celui du cholestanol. En pareil cas, la fraction stérolique devra être analysée deux fois, avec et sans étalon interne.

Ajouter 50 ml de solution éthanolique 2M d'hydroxyde de potassium (4.2) et un peu de poudre de ponce; mettre en place le réfrigérant à reflux et porter à ébullition jusqu'à la saponification (la solution devient limpide). Continuer à chauffer pendant 20 minutes, puis verser 50 ml d'eau distillée du haut du réfrigérant. Débrancher le réfrigérant et laisser refroidir le ballon jusqu'à environ 30 °C.

Transvaser le contenu du ballon quantitativement dans une ampoule à décanter de 500 ml (3.2) en pratiquant plusieurs lavages à l'eau distillée (50 ml). Ajouter environ 80 ml d'éther éthylique (4.6) et agiter énergiquement durant environ 60 secondes. Décompresser régulièrement en retournant le décanteur et en ouvrant le robinet. Laisser reposer jusqu'à séparation complète des deux phases (Remarque 2). Transvaser ensuite le plus complètement possible la solution savonneuse dans un deuxième décanteur. Pratiquer encore deux extractions sur la phase hydro-alcoolique, selon les mêmes modalités, en utilisant 60 à 70 ml d'éther éthylique (4.6).

Remarque 2: les émulsions peuvent être éliminées par l'ajout de petites quantités d'éthanol (4.7).

Verser les trois extraits d'éther dans une ampoule à décanter contenant 50 ml d'eau. Laver à l'eau (50 ml) jusqu'à ce que l'eau de lavage ne prenne plus de teinte rosée à l'ajout d'une goutte de solution de phénolphtaléine (4.11). Après élimination de l'eau de lavage, filtrer sur du sulfate de sodium anhydre (4.4) dans un flacon de 250 ml préalablement pesé, en lavant l'ampoule et le filtre avec de petites quantités d'éther éthylique (4.6).

Évaporer le solvant par distillation dans un évaporateur rotatif, à 30 °C et sous vide. Ajouter 5 ml d'acétone (4.5) et éliminer complètement le solvant volatil sous un léger courant d'azote. Sécher le résidu à l'étuve à 103 ± 2 °C pendant 15 min. Faire refroidir dans un dessiccateur et peser à 0,1 mg près.

PARTIE 2

SÉPARATION DES FRACTIONS DES COMPOSÉS ALCOOLIQUES

1. OBJET

Fractionnement de l'insaponifiable, préparé dans la partie 1, en ses différents composés alcooliques, alcools aliphatiques, stérols et dioles triterpéniques (érythrodiol et uvaol).

2. PRINCIPE

Fractionnement de l'insaponifiable par chromatographie en couche mince (méthode de référence), révélation des plaques et raclage et extraction des bandes correspondantes. Une autre méthode de séparation consiste à procéder par CLHP sur colonne de gel de silice avec détecteur UV, en collectant les différentes fractions. Les alcools aliphatiques et les alcools triterpéniques, d'un côté, ainsi que les stérols et les dioles triterpéniques, de l'autre, sont isolés conjointement.

3. APPAREILLAGE

Le matériel courant de laboratoire, et notamment les éléments suivants:

3.1. équipement complet pour chromatographie en couche mince, avec plaques de verre de 20 × 20 cm,

3.2. lampe à lumière ultraviolette d'une longueur d'onde de 366 ou 254 nm,

3.3. microseringues de 100 µl et 500 µl,

3.4. ampoule cylindrique filtrante à filtre poreux G 3 (porosité 15 à 40 µm) d'environ 2 cm de diamètre et 5 cm de hauteur, appropriée pour la filtration sous vide, avec embout rodé mâle,

3.5. fiole conique de 50 ml avec embout rodé femelle adaptable à l'ampoule filtrante (3.4),

3.6. tube à essai à fond conique de 10 ml, avec bouchon hermétique en verre,

3.7. dessiccateur au dichlorure de calcium.

3.8. Système CLHP constitué des éléments suivants:

3.8.1. pompe binaire,

3.8.2. injecteur manuel ou automatique muni d'une boucle d'injection de 200 µl,

3.8.3. dégazeur en ligne,

3.8.4. détecteur UV-VIS ou IR,

3.9. colonne CLHP (25 cm x 4 mm de diamètre interne) avec gel de silice 60 (granulométrie 5 µm),

3.10. filtre à seringues, 0,45 µm.

3.11. Fiole conique de 25 ml.

4. RÉACTIFS

4.1. Hydroxyde de potassium (titre minimum 85 %).

4.2. Hydroxyde de potassium en solution éthanolique à environ 2 M.

Dissoudre, tout en refroidissant, 130 g d'hydroxyde de potassium (4.1) dans 200 ml d'eau distillée, puis compléter jusqu'à un litre avec de l'éthanol (4.9). Conserver cette solution dans des bouteilles en verre sombre bien fermées pendant 2 jours au maximum.

4.3. Éther éthylique pour analyses.

4.4. Hydroxyde de potassium en solution éthanolique à environ 0,2 M.

Dissoudre 13 g d'hydroxyde de potassium (4.1) dans 20 ml d'eau distillée, puis compléter jusqu'à un litre avec de l'éthanol (4.9).

4.5. Plaques de verre (20 cm × 20 cm) recouvertes de gel de silice sans indicateur de fluorescence, de 0,25 mm d'épaisseur (disponibles dans le commerce déjà prêtes à l'emploi).

4.6. Acétone, de qualité chromatographique.

4.7. n-Hexane pour chromatographie.

4.8. Éther éthylique pour chromatographie.

4.9. Éthanol pour analyses.

4.10. Acétate d'éthyle pour analyses.

4.11. Solution de référence pour la chromatographie en couche mince: solution à 5 % de cholestérol, phytostérols, alcools et érythrodiol dans de l'acétate d'éthyle (4.10).

4.12. Solution éthanolique à 0,2 % de dichloro-2′,7′ fluorescéine. Ajouter quelques gouttes d'une solution alcoolique 2M d'hydroxyde de potassium (4.2) pour la rendre légèrement basique.

4.13. Mélange 65:35 (v/v) de n-Hexane (4.7) et éther éthylique (4.8).

4.14. Phase mobile pour CLHP: mélange 1:1 (v/v) de n-Hexane (4.7) et éther éthylique (4.8).

5. MÉTHODE DE RÉFÉRENCE: SÉPARATION DES COMPOSÉS ALCOOLIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE (CCM)

Préparation des plaques basiques de chromatographie en couche mince. Enfoncer les plaques de gel de silice (4.5) dans environ 4 cm de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0,2 M (4.4) pendant 10 secondes, puis les laisser sécher dans une hotte pendant deux heures avant de les placer dans une étuve à 100 °C pendant une heure.

Sortir les plaques de l'étuve et les conserver dans un dessiccateur au chlorure de calcium (3.7) jusqu'au moment de l'emploi (les plaques ainsi traitées doivent être employées dans les quinze jours).

Introduire le mélange hexane/éther éthylique (4.13) (Remarque 3) dans la cuve de développement, à une profondeur d'environ 1 cm. Fermer la cuve à l'aide du couvercle approprié et laisser ainsi pendant au moins une demi-heure, dans un endroit frais, de façon que l'équilibre liquide/vapeur s'établisse. Il est possible de placer sur les surfaces internes de la cuve des bandes de papier filtre qui plongent dans l'éluant: cette précaution permet de réduire d'un tiers environ les temps de migration du front du liquide et d'obtenir une élution plus uniforme des composants.

Remarque 3: Afin d'avoir des conditions d'élution parfaitement reproductibles, le mélange doit être renouvelé à chaque essai. Un solvant n-hexane/éther éthylique 50:50 (V/V) peut également être utilisé.

Préparer une solution à 5 % environ d'insaponifiable préparé dans la partie 1 dans l'acétate d'éthyle (4.10) et, à l'aide de la microseringue de 100 µl (3.3), déposer 0,3 ml de cette solution en une ligne continue fine et uniforme à l'extrémité inférieure (2 cm) de la plaque chromatographique (4.5). À la hauteur de cette ligne, déposer 2 à 3 µl de la solution de référence (4.11) afin de pouvoir repérer les bandes des stérols, des diols triterpéniques et des alcools après migration.

Placer la plaque dans la cuve de développement (3.1). La température ambiante doit être maintenue entre 15 et 20 °C (Remarque 4). Fermer aussitôt la cuve avec le couvercle et laisser éluer jusqu'à ce que le front de solvant arrive à environ 1 cm du bord supérieur de la plaque. Sortir ensuite la plaque de la cuve de développement et faire évaporer le solvant dans un courant d'air chaud ou bien en laissant la plaque sous hotte pendant un petit moment.

Remarque 4: des températures plus élevées pourraient être moins favorables à la séparation.

Vaporiser la plaque légèrement et uniformément avec la solution de dichloro-2′ -7′ fluorescéine (point 4.12), puis laisser sécher. Sur la plaque observée sous une lampe à rayonnement ultra-violet (3.2), les bandes des stérols, diols triterpéniques et alcools peuvent être identifiées par alignement avec les taches obtenues à l'aide de la solution de référence (4.11). Délimiter les bandes avec un crayon noir en suivant les bords de la fluorescence (voir plaque chromatographique, figure 1).

À l'aide d'une spatule métallique, racler le gel de silice présent dans la zone délimitée. Le matériau retiré, finement broyé, est introduit dans l'ampoule filtrante (3.4); Ajouter 10 ml d'acétate d'éthyle chaud (4.10), mélanger soigneusement avec la spatule métallique et filtrer (sous vide, si nécessaire). Recueillir le filtrat dans la fiole conique (3.5) reliée à l'ampoule filtrante.

Laver le résidu dans l'ampoule par trois fois à l'éther éthylique (4.3) (environ 10 ml à chaque fois) et recueillir le filtrat dans la même fiole adaptée à l'ampoule filtrante. Évaporer le filtrat jusqu'à un volume de 4 à 5 ml, transférer la solution résiduelle dans le tube de 10 ml (3.6) pesé au préalable, laisser évaporer complètement en chauffant légèrement sous léger courant d'azote, reprendre avec quelques gouttes d'acétone (point 4.6) et laisser de nouveau évaporer complètement. Le résidu contenu dans le tube est constitué de la fraction des stérols et diols triterpéniques ou de la fraction des alcools et alcools triterpéniques.

6. SÉPARATION DE LA FRACTION ALCOOLIQUE PAR CLHP

Dissoudre dans 3 ml de phase mobile (4.14) l'insaponifiable obtenu comme indiqué dans la partie 1, filtrer la solution avec un filtre à seringues (3.10) et réserver.

Injecter dans l'équipement de CLHP (3.8) 200 µl de solution insaponifiable filtrée.

Procéder à la séparation par CLHP à un débit de 0,8 ml/mn, éliminer l'éluat des 5 premières minutes, recueillir l'éluat dans des fioles coniques de 25 ml (3.11) entre les 5 et 10 premières minutes pour les alcools aliphatiques et triterpéniques et entre les 11 et 25 premières minutes pour les stérols ainsi que pour l'érythrodiol et l'uvaol (Remarque 5).

La séparation peut être contrôlée au moyen d'un détecteur UV à une longueur d'ondes de 210 nm ou d'un détecteur à indice de réfraction (voir figure 6).

Les fractions sont évaporées jusqu'à dessiccation puis préparées pour l'analyse chromatographique.

Remarque 5: Étant donné que l'éther éthylique peut augmenter la pression, il est nécessaire de surveiller attentivement la pression de la pompe de l'équipement CLHP et d'adapter le débit pour maintenir la pression sous contrôle.

PARTIE 3

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE EN PHASE GAZEUSE DES FRACTIONS DES COMPOSÉS ALCOOLIQUES

1. OBJET

La présente partie donne des directives générales pour la détermination par chromatographie en phase gazeuse par colonne capillaire de la composition qualitative et quantitative des composés alcooliques isolés selon la procédure indiquée dans la partie 2 de la présente méthode.

2. PRINCIPE

Les fractions obtenues à partir de l'insaponifiable par chromatographie en couche mince ou par CLHP sont transformées en triméthylsilyléthers, qui sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire avec dispositif d'injection à débit divisé et détecteur à ionisation de flamme.

3. APPAREILLAGE

Le matériel courant de laboratoire, et notamment les éléments suivants:

3.1. tube à essai à fond conique de 10 ml, avec bouchon hermétique en verre;

3.2. appareil de chromatographie en phase gazeuse pouvant être utilisé sur une colonne capillaire avec dispositif d'injection à débit divisé, composé des éléments suivants:

3.2.1. un four thermostaté pour les colonnes, pouvant maintenir la température souhaitée avec une précision de ± 1 °C;

3.2.2. un ensemble d'injection thermoréglable avec élément vaporisateur en verre persilylaté et système à débit divisé;

3.2.3. un détecteur à ionisation de flamme;

3.2.4. un système d'acquisition des données pouvant être utilisé avec l'analyseur FID (3.10.3.), avec possibilité d'intégration manuelle.

3.3. Colonne capillaire en silice fondue d'une longueur de 20 à 30 m, d'un diamètre interne compris entre 0,25 et 0,32 mm, recouverte de 5 % diphényle - 95 % diméthylpolysiloxane (phase stationnaire SE-52 ou SE-54 ou équivalent) jusqu'à obtention d'une épaisseur uniforme comprise entre 0,10 et 0,30 µm.

3.4. Microseringue d'une capacité de 10 µl, pour chromatographie en phase gazeuse, avec aiguille soudée, convenant pour l'injection à débit divisé.

4. RÉACTIFS

4.1. Pyridine anhydre pour chromatographie.

4.2. Disilazane d'hexaméthyle pour analyses.

4.3. Triméthylchlorosilane pour analyses.

4.4. Solutions échantillons des triméthylsilyléthers des stérols. À préparer au moment de l'emploi à partir des stérols et de l'érythrodiol tirés des huiles qui les contenaient.

4.5. Solution étalon de triméthylsilyléthers des alcools aliphatiques de C20 à C28. À préparer au moment de l'emploi à partir de mélanges d'alcools purs.

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

4.7. Gaz auxiliaires: hydrogène, hélium, azote et air, pour chromatographie en phase gazeuse.

4.8. Réactif de silylation, constitué d'un mélange 9: 3: 1 (V/V/V) de pyridine/hexaméthyldisilazane/triméthylchlorosilane.

4.9. n-Hexane, de qualité chromatographique.

5. PRÉPARATION DES TRIMÉTHYL-SILYL-ÉTHERS

Ajouter le réactif de silylation (4.8) (Remarque 6), à raison de 50 µl par milligramme de composé alcoolique, dans le tube (3.1) contenant la fraction de composé alcoolique, en évitant toute absorption d'humidité (Remarque 7).

Remarque 6: des solutions prêtes à l'emploi sont disponibles dans le commerce. D'autres réactifs silylants sont également disponibles, tels que, par exemple, le bistriméthylsilyltrifluoracétamide + 1 % de triméthylchlorosilane à diluer par un même volume de pyridine anhydre. La pyridine peut être remplacée par la même quantité d'acétonitrile.

Remarque 7: la formation éventuelle d'une légère opalescence est normale et n'est la cause d'aucune anomalie. La formation d'une floculation blanche ou l'apparition d'une coloration rose sont l'indice de la présence d'humidité ou d'altération du réactif. En pareil cas, l'essai doit être répété (uniquement en cas d'utilisation d'hexaméthyldisilazane ou de triméthylchlorosilane).

Boucher le tube (3.1), agiter soigneusement (sans retourner) jusqu'à solubilisation complète des composés. Laisser reposer pendant au moins 15 minutes à température ambiante, puis centrifuger pendant quelques minutes. La solution limpide est prête pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

6. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

6.1. Opérations préliminaires, conditionnement de la colonne capillaire

Installer la colonne (3.3) dans le chromatographe, en reliant l'extrémité d'entrée à l'injecteur à débit divisé et l'extrémité de sortie au détecteur.

Effectuer les contrôles habituels du système de chromatographie en phase gazeuse (étanchéité du circuit des gaz, efficacité du détecteur, efficacité du système diviseur et du système d'enregistrement, etc.).

Si la colonne est utilisée pour la première fois, il est conseillé de procéder à son conditionnement: faire passer un léger flux de gaz à travers cette colonne, puis mettre le chromatographe en marche et chauffer graduellement jusqu'à atteindre une température excédant d'au moins 20 °C la température de travail (Remarque 8). Maintenir cette température pendant au moins deux heures, puis mettre l'ensemble du système de chromatographie en mode de fonctionnement (réglage des débits gazeux et du système diviseur, allumage de la flamme, raccordement avec l'enregistreur électronique, réglage de la température de la colonne, du détecteur et de l'injecteur, etc.), puis enregistrer le signal avec une sensibilité au moins deux fois supérieure à celle prévue pour l'analyse. Le tracé de la ligne de base obtenue doit être linéaire, exempt de pic de quelque nature que ce soit et ne doit pas présenter de dérive. Une dérive rectiligne négative indique une étanchéité imparfaite des connexions de la colonne, une dérive positive indique un conditionnement insuffisant de la colonne.

Remarque 8: la température de conditionnement doit être toujours inférieure d'au moins 20 °C à la température maximale prévue pour la phase stationnaire utilisée.

6.2. Conditions d'utilisation

Optimiser le programme de température et le débit du gaz vecteur de manière à obtenir des chromatogrammes similaires à ceux des figures 3 à 6.

Les paramètres suivants ont été testés et jugés utiles:

6.2.1. Alcools aliphatiques

Programme de température du four	180 °C (8 mn) → 260 °C (gradient de 5 °C/mn) → 260 °C (15 mn)
Température de l'injecteur	280 °C
Température du détecteur	290 °C
Vitesse linéaire du gaz vecteur	Hélium (20 à 30 cm/s); Hydrogène (30 à 50 cm/s)
Rapport de division	de 1/50 à 1/100
Volume injecté	de 0,5 à 1 µl de solution de triméthyl-silyl-éthers.

6.2.2. Stérols et diols triterpéniques

Programme de température du four	260 ± 5 °C, conditions isothermiques
Température de l'injecteur	280 – 300 °C
Température du détecteur	280 – 300 °C
Vitesse linéaire du gaz vecteur	Hélium (20 à 30 cm/s); Hydrogène (30 à 50 cm/s)
Rapport de division	de 1/50 à 1/100
Volume injecté	de 0,5 à 1 µl de solution de triméthyl-silyl-éthers.

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, de façon à obtenir des chromatogrammes satisfaisant aux conditions suivantes:

— le temps de rétention de l'alcool en C26 doit être de 18 ± 5 minutes.

— le pic de l'alcool en C22 doit être 80 % ± 20 % fond d'échelle pour l'huile d'olive et 40 % ± 20 % fond d'échelle pour l'huile de grignons d'olive.

— le temps de rétention du ß-sitostérol doit être de 20 mn ± 5 mn;

— le pic du campestérol doit être: pour l'huile d'olive (teneur moyenne 3 %) 20 % ± 5 % fond d'échelle.

— tous les stérols présents doivent être séparés. Les pics doivent être non seulement séparés mais aussi complètement résolus, c'est-à-dire que le tracé du pic doit rejoindre la ligne de base avant la sortie du pic suivant. Une résolution incomplète est toutefois tolérée à condition toutefois que le pic à RRT 1,02 (sitostanol) soit quantifiable en utilisant la perpendiculaire.

6.3. Procédure d'analyse

À l'aide de la microseringue de 10 µl (3.4), prélever 1 µl d'hexane, aspirer 0,5 µl d'air, puis 0,5 à 1 µl de la solution échantillon. Tirer à nouveau le piston de la seringue de façon que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille à travers la membrane de l'injecteur et, après une à deux secondes, injecter rapidement et extraire ensuite l'aiguille lentement, au bout de cinq secondes environ. Un injecteur automatique peut également être employé.

Procéder à l'enregistrement jusqu'à élution complète des triméthylsilyéthers des composés alcooliques présents. La ligne de base doit continuer de satisfaire aux conditions opératoires correspondantes (6.2.1 ou 6.2.2).

6.4. Identification des pics

L'identification des différents pics est effectuée sur la base des temps de rétention et par comparaison avec le mélange des alcools aliphatiques et alcools triterpéniques, d'une part, et des stérols et des diols triterpéniques, d'autre part, analysés dans les mêmes conditions. La figure 3 représente un chromatogramme des alcools aliphatiques et triterpéniques et la figure 2 les chromatogrammes correspondants des stérols et des diols triterpéniques.

Les alcools aliphatiques sont élués dans l'ordre suivant: C20-ol (S.I.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol et C28-ol.

Les stérols et les diols triterpéniques sont élués dans l'ordre suivant: cholestérol, brassicastérol, ergostérol, 24-méthylène-cholestérol, campestérol, campestanol, stigmastérol, Δ7-campestérol, Δ5,23-stigmastadiénol, clérosterol, ß-sistostérol, sitostanol, Δ5-avenastérol, Δ5,24-stigmastadiénol, Δ7-stigmasténol, Δ7-avenastérol, érythrodiol et uvaol.

6.5. Évaluation quantitative

Procéder, au moyen d'un système d'acquisition des données, au calcul de l'aire des pics du 1-eicosanol et des alcools aliphatiques C22, C24, C26 et C28. Le coefficient de réponse pour le 1-eicosanol doit être considéré comme étant égal à 1.

Procéder au calcul des aires des pics de l'α-cholestanol, des stérols et des diols triterpéniques à l'aide du système d'intégration. Ne pas tenir compte des pics des composés qui ne figurent pas dans le tableau 1 (l'aire du pic de l'ergostérol ne doit pas être calculée). Le coefficient de réponse pour l'α-cholestanol doit être considéré comme étant égal à 1.

Calculer la concentration de chaque composé alcoolique, en mg/kg de matière grasse, comme suit:

$$\textit{Composé alcoolique } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

où:

A_x = aire du pic du composé alcoolique x, en unités d'intégration;

A_s = aire du pic du 1-eicosanol/α-cholestanol, en unités d'intégration;

m_s = masse de 1-eicosanol/α-cholestanol ajoutée, en milligrammes;

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

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Déclarer les concentrations de chaque alcool aliphatique et alcool triterpénique en mg/kg de matière grasse et la somme des différentes concentrations en tant que «teneur totale en alcools aliphatiques». La teneur totale est la somme de C22, C24, C26 et C28.

La composition de chacun des composés alcooliques est exprimée par des nombres à une décimale.

La teneur en stérols totaux est exprimée par un nombre entier.

Calculer le pourcentage de chaque stérol à partir du rapport entre l'aire du pic correspondant et la somme des aires des pics des stérols:

$$\textit{Stérol } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

où:

A_x = aire du pic du stérol x;

ΣA = somme des aires des pics des stérols.

β-sitostérol apparent: Δ5,23-stigmastadiénol + clérostérol + β-sitostérol + sitostanol + Δ5-avenastérol + Δ5,24-stigmastadiénol.

Calculer le pourcentage d'érytrodiol et d'uvaol:

$$\text{Érythrodiol} + \text{Uvaol} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

où:

A_{Er} = aire du pic d'érythrodiol, en unités d'intégration;

A_{Uv} = aire du pic d'uvaol, en unités d'intégration.

Σ_{AT} = somme des aires des pics des stérols, de l'érythrodiol et de l'uvaol, en unités d'intégration.

En plus du pourcentage relatif de chaque stérol et diol triterpénique et de la concentration totale en stérols, calculer la concentration d'érythrodiol et d'uvaol et ainsi que la somme de ces concentrations, en mg/kg de matière grasse, au moyen des formules suivantes:

$$\text{Érythrodiol} = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$\text{Uvaol} = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

où:

A_{Er} = aire du pic d'érythrodiol, en unités d'intégration;

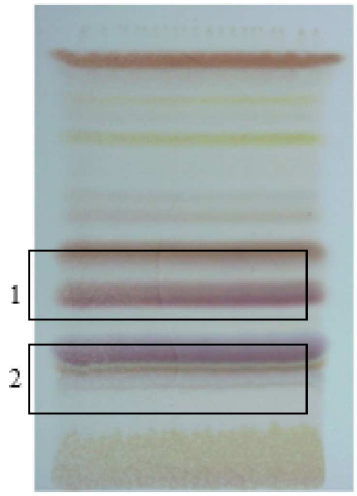
A_{Uv} = aire du pic d'uvaol, en unités d'intégration.

A_s = aire du pic d'α-cholestanol, en unités d'intégration;

m_s = masse d'α-cholestanol ajoutée, en milligrammes;

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

Appendice



1 Hydrocarbures
2 α-tocophérol
3 Prénols
4 Alcools triterpéniques
5 Alcools aliphatiques
6 Méthyl-stérols
7 Stérols
8 Diols triterpéniques

Figure 1- Chromatographie en couche mince de la fraction insaponifiable d'huile de grignons d'olive éluée deux fois au moyen d'un mélange 65:35 d'héxane et d'éther diéthylique, révélé avec H_2SO_4 (50 %) et chauffé. Les bandes à racler sont celles délimitées par les rectangles: 1 désigne les bandes des alcools aliphatiques et 2 celles des stérols et des diols triterpéniques.

Tableau I - Temps de rétention relatifs des stérols

Pic	Identification		Temps de rétention relatifs	
			Colonne SE 54	Colonne SE 52
1	Cholestérol	Δ-5-cholestén-3ß-ol	0,67	0,63
2	Cholestanol	5α-cholestan-3ß-ol	0,68	0,64
3	Brassicastérol	[24S]-24-méthyl-Δ-5,22-cholestadién-3β-ol	0,73	0,71
*	Ergostérol	[24S]-24-méthyl-Δ-5,7,22-cholestatrién-3β-ol	0,78	0,76
4	24-méthylène-cholestérol	24-méthylène-Δ-5,24-cholestadién-3ß-o1	0,82	0,80
5	Campestérol	(24R)-24-méthyl-Δ-5-cholestén-3ß-ol	0,83	0,81
6	Campestanol	(24R)-24-méthyl-cholestan-3ß-ol	0,85	0,82
7	Stigmastérol	(24S)-24-éthyl-Δ-5,22-cholestadién-3ß-ol	0,88	0,87
8	Δ-7-campestérol	(24R)-24-méthyl-Δ-7-cholestén-3ß-ol	0,93	0,92
9	Δ-5,23-stigmastadiénol	(24R,S)-24-éthyl-Δ-5,23-choIestadién-3ß-ol	0,95	0,95
10	Clérostérol	(24S)-24-éthyl-Δ-5,25-cholestadién-3ß-ol	0,96	0,96

Pic	Identification		Temps de rétention relatifs	
			Colonne SE 54	Colonne SE 52
11	ß-sitostérol	(24R)-24-éthyl-Δ-5-cholestén-3ß-ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-éthyl-cholestan-3ß-ol	1,02	1,02
13	Δ-5-avénastérol	(24Z)-24-éthylidène-Δ-cholestén-3ß-ol	1,03	1,03
14	Δ-5,24-stigmastadiénol	(24R,S)-24-éthyl-Δ-5,24-cholestadién-3ß-ol	1,08	1,08
15	Δ-7-stigmasténol	(24R,S)-24-éthyl-Δ-7-cholestén-3ß-ol	1,12	1,12
16	Δ-7-avénastérol	(24Z)-24-éthylidène-Δ-7-cholestén-3ß-ol	1,16	1,16
17	Érythrodiol	5-α-oléan-12-én-3β,28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ12-ursen-3β,28-diol	1,52	1,52

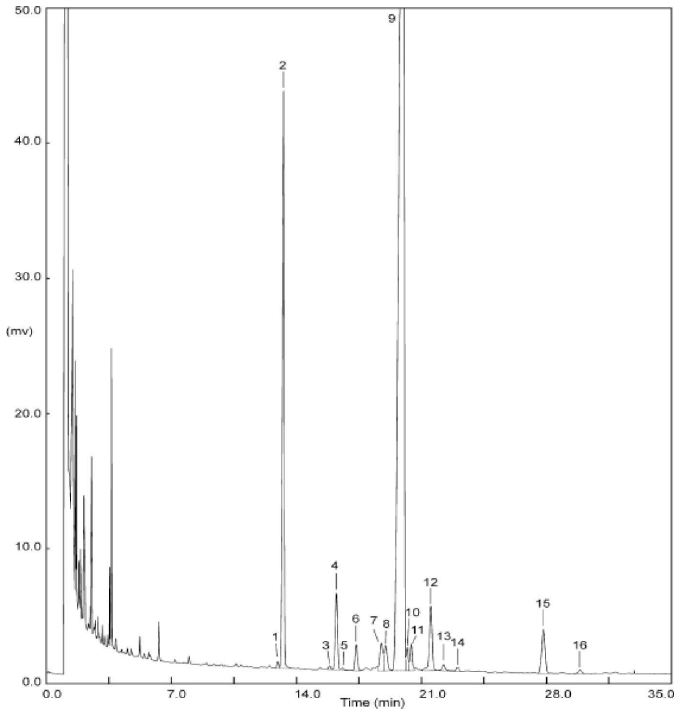


Figure 2 - Profil de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme des stérols et des diols triterpéniques de l'huile d'olive raffinée. 1) Cholestérol, 2) α-cholestanol (I.S.), 3) 24-méthylencholestérol, 4) campestérol, 5) campestanol, 6) stigmastérol, 7) Δ5,23-stigmastadiénol, 8) clérostérol, 9) β-sitostérol, 10) sitostanol, 11) Δ-5-avénastérol, 12) Δ5,24-stigmastadiénol, 13) Δ7-stigmasténol, 14) Δ7-avénastérol, 15) érythrodiol, 16) uvaol.

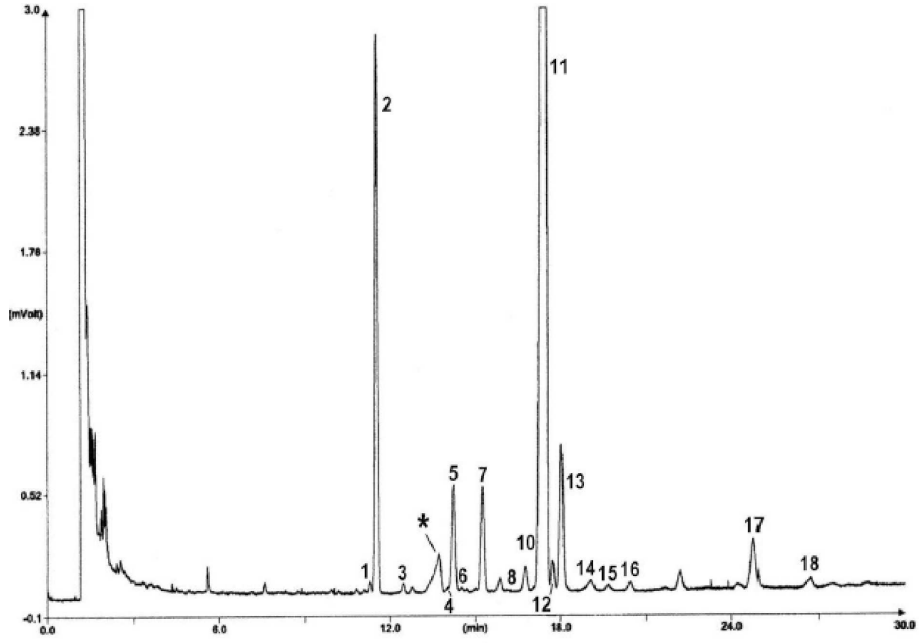


Figure 3 - Profil de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme des stérols et des diols triterpéniques de l'huile d'olive lampante. 1) Cholestérol, 2) α-cholestanol, 3) brassicastérol, 4) 24-méthylencholestérol, 5) campestérol, 6) campestanol, 7) stigmastérol, 8) Δ7-campestérol, 9) Δ5,23-stigmastadiénol, 10) clérostérol, 11) β-sitostérol, 12) sitostanol, 13) Δ-5-avénastérol, 14) Δ5,24-stigmastadiénol, 15) Δ7-stigmasténol, 16) Δ7-avénastérol, 17) érythrodiol, 18) uvaol.

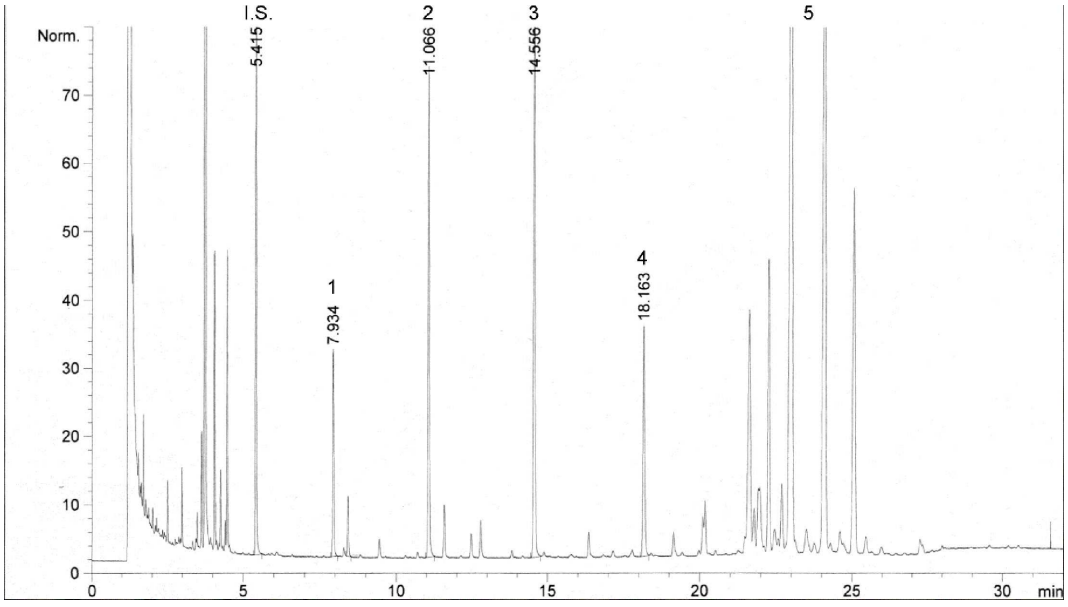


Figure 4 - Profil de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme des alcools aliphatiques et des alcools triterpéniques de l'huile d'olive. (I.S.) C20-ol, 1) C22-ol, 2) C24-ol, 3) C26-ol, 4) C28-ol, 5) alcools triterpéniques.

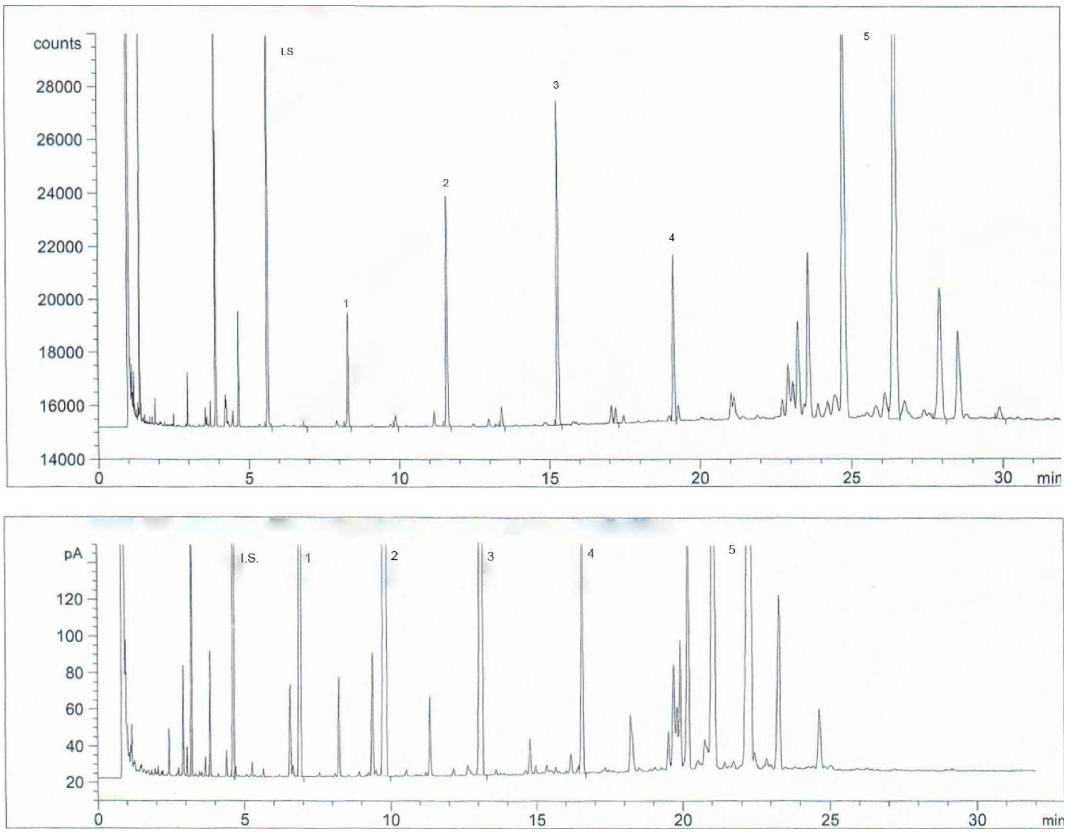


Figure 5 - Profil de chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme des alcools aliphatiques et des alcools triterpéniques d'une huile d'olive raffinée et d'une huile d'olive de deuxième centrifugation. (I. S.) C20-ol, 1) C22-ol, 2) C24-ol, 3) C26-ol, 4) C28-ol, 5) alcools triterpéniques.

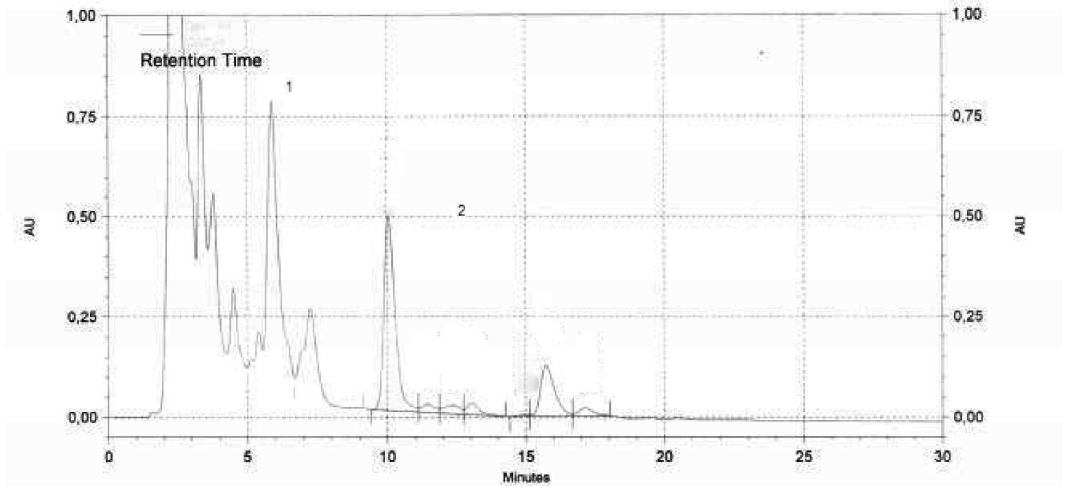


Figure 6 - Profil CLHP d'une fraction insaponifiable d'huile d'olive, séparée par CLHP au moyen d'un détecteur UV. 1) Alcools aliphatiques et alcools triterpéniques; 2) Stérols et diols triterpéniques.»