II

(Actes non législatifs)

RÈGLEMENTS

RÈGLEMENT (UE) Nº 61/2011 DE LA COMMISSION

du 24 janvier 2011

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 (CE) nº 1234/2007 du Conseil du 22 octobre 2007 portant organisation commune des marchés dans le secteur agricole et dispositions spécifiques en ce qui concerne certains produits de ce secteur (règlement «OCM unique») [1], et notamment son article 113, paragraphe 1, point a), et son article 121, point h), en liaison avec son article 4,

considérant ce qui suit:

(1) Le règlement (CEE) nº 2568/91 de la Commission [2] définit les caractéristiques physiques et chimiques des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive ainsi que les méthodes d'analyse de ces caractéristiques. Ces méthodes ainsi que les valeurs limites relatives aux caractéristiques des huiles doivent être mises à jour en tenant compte de l'avis des experts chimistes et en concordance avec les travaux accomplis dans le cadre du Conseil oléicole international.

(2) En particulier, depuis que les experts chimistes ont conclu que la teneur en esters éthyliques et méthyliques d'acides gras constitue un paramètre utile pour déterminer la qualité des huiles d'olive vierges extra, il y a lieu d'introduire des valeurs limites pour ces esters ainsi qu'une méthode visant à déterminer leur teneur.

(3) Pour permettre une période d'adaptation aux nouvelles normes et la mise en place des moyens nécessaires à leur application ainsi que pour ne pas perturber les transactions commerciales, il convient que les modifications prévues au présent règlement soient applicables à partir du 1er avril 2011. Pour les mêmes raisons il convient de prévoir que les huiles d'olive et de grignons d'olive légalement fabriquées et étiquetées dans l'Union ou légalement importées dans l'Union et mises en libre pratique avant ladite date puissent être commercialisées jusqu'à l'épuisement des stocks.

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

(5) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité de gestion 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) À l'article 2, paragraphe 1, le tiret suivant est ajouté:

«— pour la détermination de la teneur en cires et en esters méthyliques et éthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, la méthode reprise à l'annexe XX.»;

2) Dans le sommaire des annexes, l'entrée suivante est ajoutée:

«Annexe XX: méthode de détermination de la teneur en cires et en esters méthyliques et éthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire»;

3) L'annexe I est remplacée par le texte figurant à l'annexe I du présent règlement;

4) L'annexe XX, dont le texte figure à l'annexe II du présent règlement, est ajoutée.

Article 2

Les produits légalement fabriqués et étiquetés dans l'Union ou légalement importés dans l'Union et mis en libre pratique avant le 1er avril 2011 peuvent être commercialisés jusqu'à l'épuisement des stocks.

[1] JO L 299 du 16.11.2007, p. 1.
[2] JO L 248 du 5.9.1991, p. 1.

Article 3

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

Il s'applique à compter du 1er avril 2011.

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

Fait à Bruxelles, le 24 janvier 2011.

Par la Commission
Le président
José Manuel BARROSO

ANNEXE I

«ANNEXE I

CARACTERISTIQUES DES HUILES D'OLIVE

Catégorie	Esters méthyliques d'acides gras (EMAG) et esters éthyliques d'acides gras (EEAG)	Acidité (%) (*)	Indice de peroyxide mEq O_2/kg (*)	Cires mg/kg (**)	2 glyceril monopalmitate (%)	Stigmastadiène mg/kg (1)	Différence ECN42 HPLC - et ECN42 Calcul théorique	K_{232} (*)	K_{270} (*)	Delta-K (*)	Évaluation organoleptique Médiane du défaut (Md) (*)	Évaluation organoleptique Médiane du fruité (Mf) (*)
1. Huile d'olive vierge extra	Σ EMAG + EEAG ≤ 75 mg/kg ou 75 mg/kg <Σ EMAG + EEAG ≤ 150 mg/kg et (EEAG/EMAG) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % Acide palmitique total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % Acide palmitique total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Huile d'olive vierge	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % Acide palmitique total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % Acide palmitique total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
3. Huile d'olive lampante	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 si % Acide palmitique total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % Acide palmitique total > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (2)	—
4. Huile d'olive raffinée	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 si % Acide palmitique total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % Acide palmitique total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Huile d'olive composée d'huile d'olive raffinée et d'huile d'olive	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 si % Acide palmitique total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % Acide palmitique total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Huile de grignons d'olive brute	—	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Huile de grignons d'olive raffinée	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Huile de grignons d'olive	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Somme des isomères qui pourrait (ou pas) être séparés par colonne capillaire.
(2) Ou lorsque la médiane des défauts est inférieure ou égale à 2,5 et la médiane du fruité est égale à 0.
(3) Les huiles avec une teneur en cires comprise entre 300mg/kg et 350 mg/kg sont considérées comme huile d'olive lampante si les alcools aliphatiques totaux sont inférieurs ou égaux à 350 mg/kg ou si le pourcetage en erytrodiol et uvaol est inférieur ou égal à 3,5.
(4) Les huiles avec une teneur en cires comprise entre 300mg/kg et 350 mg/kg sont considérées comme huile de grignons d'olive brute si les alcools aliphatiques totaux sont supérieur à 350 mg/kg et si le pourcentage en erytrodiol et uvaol est supérieur à 3,5,

Catégorie	Teneur en acides ([1])						Sommes des Isomères trans-oléiques (%)	Sommes des Isomères Translino-léiques + translino-léniques (%)	Composition des stérols						Stérols totaux (mg/kg)	Erythrodiol et uvaol (%) (**)
	Myristique (%)	Linolé-nique (%)	Arachi-dique (%)	Eicose-noïque (%)	Béhénique (%)	Lignocé-rique (%)			Cholestérol (%)	Brassicas-térol (%)	Campestérol (%)	Stigmas-térol (%)	Bétasitos-térol (%) ([2])	Delta-7-Stigmas-ténol (%)		
1. Huile d'olive vierge extra	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Huile d'olive vierge	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Huile d'olive lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ([3])
4. Huile d'olive raffinée	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Huile d'olive composée d'huile d'olive raffinée et d'huile d'olive vierge	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Huile de grignons d'olive brute	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ([4])
7. Huile de grignons d'olive raffinée	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Huile de grignons d'olive	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

([1]) Teneur en autres acides gras (%): palmitique: 7,5 - 20,0; palmitoléique: 0,3 - 3,5; heptadécanoïque: ≤ 0,3; heptadécénoïque: ≤ 0,3; stéarique: 0,5 - 5,0; oléique: 55,0 - 83,0; linoléique: 3,5 - 21,0

([2]) Somme de : Delta-5-23-Stigmastadiénol+Clérostérol+Bêta-Sitostérol+Sitostanol+Delta-5-Avénastérol+Delta-5-24-Stigmastadiénol.

([3]) Les huiles avec une teneur en cires comprise entre 300mg/kg et 350 mg/kg sont considérées comme huile d'olive lampante si les alcools aliphatiques totaux sont inférieurs ou égaux à 350 mg/kg ou si le pourcetage en erytrodiol et uvaol est inférieur ou égal à 3,5.

([4]) Les huiles avec une teneur en cires comprise entre 300mg/kg et 350 mg/kg sont considérées comme huile de grignons d'olive brute si les alcools aliphatiques totaux sont supérieurs à 350 mg/kg et si le pourcentage en erytrodiol et uvaol est supérieur à 3,5.

Notes:

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

b) Il suffit qu'une seule caractéristique ne soit pas conforme aux valeurs indiquées pour que l'huile soit changée de catégorie ou déclarée non conforme quant à sa pureté.

c) Les caractéristiques indiquées avec astérisque (*), se réfèrant à la qualité de l'huile, impliquent que:
— pour l'huile d'olive lampante, les limites y relatives peuvent ne pas être simultanément respectées;
— pour les huiles d'olive vierges, le non-respect d'au moins une de ces limites comporte un changement de catégorie, tout en restant classées dans une des catégories des huiles d'olive vierges.

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

ANNEXE II

«ANNEXE XX

Méthode de détermination de la teneur en cires et en esters méthyliques et éthyliques d'acides gras par chromatographie gazeuse sur colonne capillaire

1. OBJET

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

2. PRINCIPE

L'huile, additionnée d'étalons internes appropriés, est fractionnée par chromatographie sur colonne de gel de silice hydraté ; la fraction éluée dans les conditions de l'essai (à polarité inférieure à celle des triglycérides) est recueillie puis analysée directement par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

3. APPAREILLAGE

3.1. **Erlenmeyer de 25 ml.**

3.2. **Colonne en verre** pour chromatographie en phase liquide, diamètre intérieur 15,0 mm, hauteur 30 à 40 cm, équipée d'un robinet approprié.

3.3. **Appareil de chromatographie en phase gazeuse** approprié pour le fonctionnement avec colonne capillaire, équipé d'un système d'injection directe sur colonne, constitué des éléments suivants:

3.3.1. **Four à thermostat équipé d'un programmateur de température**.

3.3.2. **Injecteur à froid** pour introduction directe dans la colonne

3.3.3. **Détecteur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur**.

3.3.4. **Enregistreur-intégrateur** (Note 1) approprié pour fonctionner avec le convertisseur-amplificateur (point 3.3.3), vitesse de réponse non supérieure à 1 seconde et vitesse de déroulement du papier variable.

Note 1: Il est également possible d'utiliser des systèmes informatisés qui permettent la saisie des données de chromatographie en phase gazeuse au moyen d'un ordinateur.

3.3.5. **Colonne capillaire, silice fondue (pour analyse des cires et des esters méthyliques et éthyliques)**, longueur 8 à 12 m, diamètre intérieur 0,25 à 0,32 mm, recouverte à l'intérieur de liquide de répartition (Note 2) à l'épaisseur uniforme comprise entre 0,10 et 0,30 µm.

Note 2: Il existe des phases liquides dans le commerce qui peuvent être utilisées à cette fin, telles que SE52 ou SE 54.

3.4. **Microseringue** de 10 µl, équipée d'une aiguille en acier trempé, pour injection directe sur colonne.

3.5. **Agitateur électrique.**

3.6. **Évaporateur rotatif.**

3.7. **Four à moufle.**

3.8. Balance **analytique** garantissant une précision de la mesure de ± 0,1 mg.

3.9. Verrerie normale de laboratoire.

4. RÉACTIFS

4.1. **Gel de silice**, d'une granulométrie comprise entre 60 et 200 µm mesh [NdT: les deux unités de mesure coexistent dans l'original]. Le gel de silice doit être placé dans le four à moufle à 500 °C pendant au moins 4 h. Après refroidissement, y ajouter 2 % d'eau par rapport à la quantité de gel de silice utilisée. Agiter convenablement afin d'homogénéiser la suspension. Conserver dans le dessiccateur pendant au moins 12 heures avant emploi.

4.2. **n-hexane**, pour chromatographie ou analyse de résidus (la pureté doit être vérifiée).

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

4.3. **Éther éthylique, pour chromatographie.**

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

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

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

4.5. **Solution étalon d'arachidate laurique** (*Note 3*), diluée à 0,05 % (m/V) dans de l'heptane (étalon interne pour cires).

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

4.6. **Solution étalon d'heptadécanoate méthylique, diluée à 0,02 % (m/V) dans de l'heptane (étalon interne pour esters méthyliques et éthyliques).**

4.7. **Soudan 1 (1-phényl-azo-2-naphthol)**

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

AVERTISSEMENT:

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

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

4.9. **Gaz auxiliaires**:

— hydrogène pur, pour chromatographie en phase gazeuse.

— air pur, pour chromatographie en phase gazeuse.

AVERTISSEMENT:

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

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. **Préparation de la colonne chromatographique**

Mettre 15 g de gel de silice (point 4.1) en suspension dans le n-hexane (point 4.2) et l'introduire dans la colonne (point 3.2). Laisser se déposer spontanément, puis utiliser un agitateur électrique pour rendre la couche chromatographique plus homogène. Filtrer 30 ml de n-hexane afin d'éliminer les impuretés éventuelles. Peser exactement à l'aide de la balance analytique (point 3.8) environ 500 mg de l'échantillon dans l'Erlenmeyer de 25 ml (point 3.1). Ajouter une quantité appropriée d'étalon interne (point 4.5), en fonction du contenu présumé de cires. Par exemple, ajouter 0,1 mg d'arachidate laurique dans le cas de l'huile d'olive et 0,25 à 0,5 mg dans le cas de l'huile de grignons d'olive et 0,05 mg de heptadécanoate méthylique dans le cas des huiles d'olive (point 4.6).

Introduire l'échantillon ainsi préparé dans la colonne chromatographique à l'aide de deux fractions de 2 ml de n-hexane (point 4.2.).

Laisser couler le solvant jusqu'à 1 mm au-dessus du niveau supérieur de l'absorbant. Filtrer [NdT: passage manquant dans l'original] supplémentaires de n-hexane/éther éthylique (99:1) et recueillir 220 ml à un débit d'environ 15 gouttes toutes les 10 secondes. **(Cette fraction contient les esters méthyliques et éthyliques et les cires)**. (*Note 4*) (*Note 5*).

Note 4: Un nouveau mélange n-hexane/éther éthylique (99:1) doit être préparé chaque jour.

Note 5: Pour contrôler visuellement l'élution correcte des cires, il est possible d'ajouter à la solution échantillon 100µl de colorant soudan I dilué à 1 % dans le mélange d'élution.

Le colorant ayant un temps de rétention compris entre celui des cires et des triglycérides, il convient de suspendre l'élution lorsque le colorant atteint le fond de la colonne chromatographique, car toutes les cires ont alors été éluées.

Évaporer les fractions ainsi obtenues dans l'évaporateur rotatif jusqu'à l'évacuation pratiquement totale du solvant. Les 2 derniers ml sont évacués avec un faible flux d'azote. Recueillir la fraction contenant les esters méthyliques et éthyliques est diluée avec 2 à 4 ml de n-heptane ou d'iso-octane [NdT: cette phrase est entachée d'une erreur de syntaxe dans l'original].

5.2. **Analyse par chromatographie en phase gazeuse**

5.2.1. *Opérations préliminaires*

Connecter la colonne et le chromatographe en phase gazeuse (point 3.3), en raccordant, d'une part, le point d'admission au système sur colonne et, d'autre part, le point de sortie au détecteur. Vérifier le bon fonctionnement de l'appareillage de chromatographie en phase gazeuse (fonctionnement des circuits des gaz, efficacité du système de détection et d'enregistrement, etc.).

Si la colonne est utilisée pour la première fois, il est recommandé de procéder à son conditionnement. Laisser s'écouler un léger débit de gaz à travers la colonne, puis allumer l'appareil de chromatographie en phase gazeuse. Chauffer graduellement jusqu'à atteindre, au bout d'environ 4 heures, une température de 350°C.

Maintenir cette température pendant au moins 2 heures, puis régler l'appareillage sur les conditions opératoires (réglage du débit de gaz, allumage de la flamme, raccordement à l'enregistreur électronique (point 3.3.4), réglage de la température du four en fonction de la colonne, réglage du détecteur, etc.) et enregistrer le signal à une sensibilité au moins deux fois supérieure à celle requise pour l'analyse. Le tracé de la ligne de base doit être linéaire, exempt de tout pic, et ne doit présenter aucune déviation.

Une déviation rectiligne négative indique que les raccordements de la colonne sont mauvais; une déviation positive indique un conditionnement inadéquat de la colonne.

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

Les conditions opératoires sont en général les suivantes:

— température de la colonne:

20 °C/min 5 °C/min

80 °C au départ (1 minute) ——— 140 °C ——— 335 °C (20)

— température du détecteur: 350 °C.

— quantité injectée: 1µl de solution de n-heptane (2-4 ml).

— gaz vecteur: hélium ou hydrogène à la vitesse linéaire optimale pour le gaz choisi (voir Appendice A).

— sensibilité instrumentale: telle qu'elle permet de satisfaire aux conditions ci-dessus.

Note 6: En raison de la température finale élevée, on admet une déviation positive qui ne doit toutefois pas être supérieure à 10 % de la valeur réelle.

Ces conditions peuvent être modifiées de façon à les adapter aux caractéristiques de la colonne et de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, afin de séparer toutes les cires et tous les esters éthyliques et méthyliques d'acides gras et d'obtenir une séparation satisfaisante des pics (voir figures 2, 3 et 4) et un temps de rétention de l'étalon interne d'arachidate laurique de 18 ± 3 minutes. Le pic des cires le plus représentatif doit être supérieur à 60 % de l'amplitude réelle, tandis que l'étalon interne d'heptadécanoate méthylique pour les esters méthyliques et éthyliques doit atteindre l'amplitude réelle.

Les paramètres d'intégration des pics doivent être déterminés de façon à obtenir une évaluation correcte des aires des pics pris en considération.

5.3. **Exécution de l'analyse**

Prélever 10 µl de la solution à l'aide de la microseringue de 10 µl; tirer le piston de la seringue en arrière jusqu'à ce que l'aiguille soit vide. Introduire l'aiguille dans le dispositif d'injection et après 1-2 secondes, injecter rapidement. Au bout d'environ 5 secondes, extraire délicatement l'aiguille.

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

La ligne de base doit toujours satisfaire aux conditions requises.

5.4. **Identification des pics**

Les différents pics sont identifiés en comparant les temps de rétention et les mélanges de cires dont les temps de rétention sont connus du fait qu'ils ont été analysés dans les mêmes conditions. Les alkyl esters sont identifiés à partir de mélanges d'esters méthyliques et éthyliques des principaux acides gras contenus dans l'huile d'olive (palmitique et oléique).

La Figure 1 représente un chromatogramme des cires d'une huile d'olive vierge. Les figures 2 et 3 représentent les chromatogrammes de deux huiles d'olive vierges extra disponibles dans le commerce, l'une contenant des esters méthyliques et éthyliques et l'autre non. La figure 4 représente le chromatogramme d'une huile d'olive vierge extra de qualité optimale et le chromatogramme de la même huile, mais qui contient des pics correspondant à 20 % d'huile désodorisée.

5.5. **Analyse quantitative des cires**

Procéder au calcul de l'aire des pics correspondant à l'étalon interne d'arachidate laurique et aux esters aliphatiques de C_{40} à C_{46} à l'aide de l'intégrateur.

Calculer la teneur totale en cires en additionnant chaque cire, en mg/kg de matière grasse, par la formule:

$$\text{Cires, mg/kg} = \frac{(A_x) \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

où:

A_x = aire correspondant au pic de chaque ester, en données de comptage sous forme numérique

A_s = aire correspondant au pic de l'étalon interne d'arachidate laurique, en données de comptage sous forme numérique

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

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

5.5.1. *Analyse quantitative des esters méthyliques et éthyliques*

Procéder au calcul des aires des pics correspondant à l'étalon interne d'heptadécanoate méthylique, aux esters méthyliques des acides gras C_{16} et C_{18} et aux esters éthyliques des acides gras C_{16} et C_{18} à l'aide de l'intégrateur.

Calculer la teneur de chacun des alkyl esters, en mg/kg de matière grasse, par la formule:

$$\text{Ester, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_{s.} \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

où:

A_x = aire correspondant au pic de chaque ester C_{16} et C_{18}, en données de comptage sous forme numérique

A_s = aire correspondant au pic de l'étalon interne d'heptadécanoate méthylique, en données de comptage sous forme numérique

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

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

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Indiquer la somme des teneurs en cires de C_{40} à C_{46} (*Note 7*), en mg/kg de matière grasse.

Indiquer la somme des teneurs en esters méthyliques et éthyliques de C_{16} à C_{18}, et le total des deux.

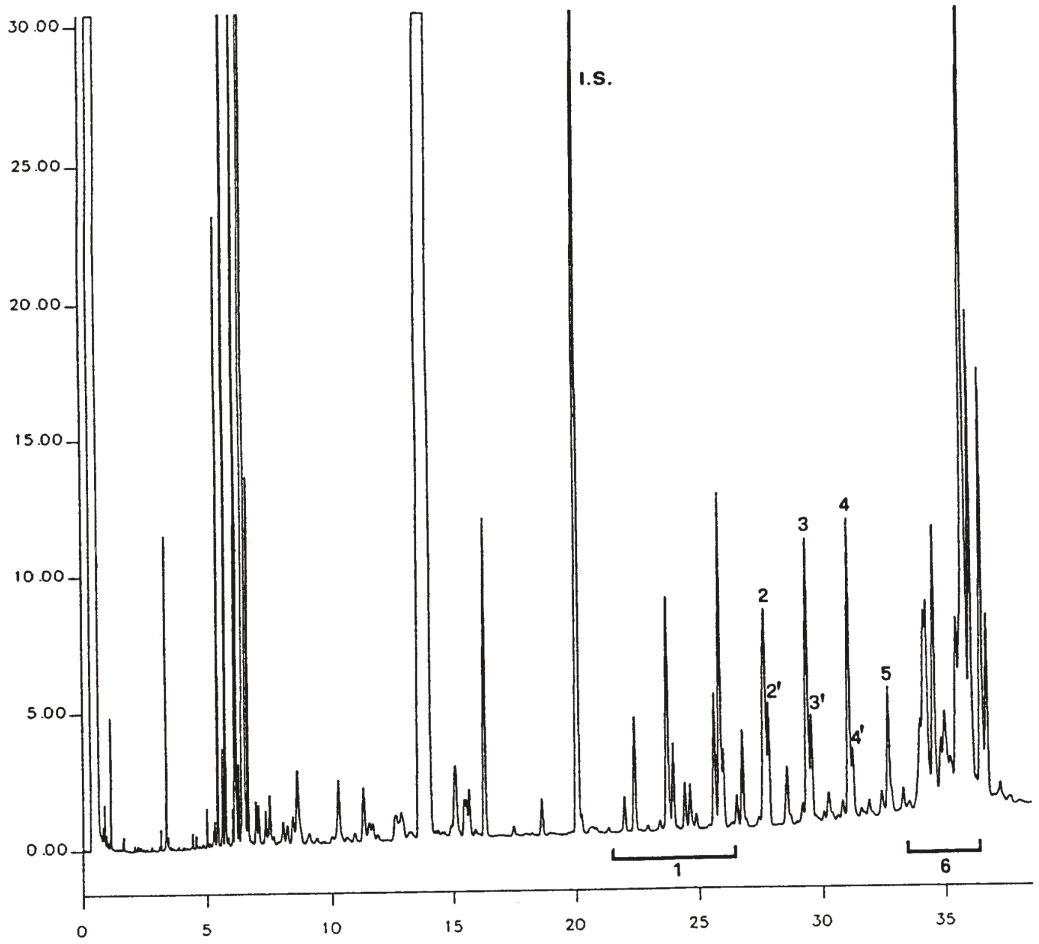
Il convient d'indiquer les résultats en arrondissant au mg/kg inférieur ou supérieur.

Note 7: Les constituants à quantifier correspondent aux pics des esters C_{40} à C_{46} ayant un nombre d'atomes de carbone pair, selon l'exemple de chromatogramme des cires contenues dans une huile d'olive reproduit dans la figure ci-après. À des fins d'identification, si l'ester C_{46} est scindé, il est conseillé d'analyser la fraction des cires d'une huile de grignons d'olive dont le pic C_{46} est clairement identifiable du fait qu'il prédomine.

Indiquer le ratio entre les esters éthyliques et les esters méthyliques.

Figure 1

Chromatogramme de la fraction de cires d'une huile d'olive, à titre d'exemple (*)



Pics avec un temps de rétention de 5 à 8 min des esters éthyliques et méthyliques d'acides gras

Légende:

I.S. = Arachidate laurique

1 = Esters diterpéniques

2+2′ = esters C_{40}

3+3′ = esters C_{42}

4+4′ = esters C_{44}

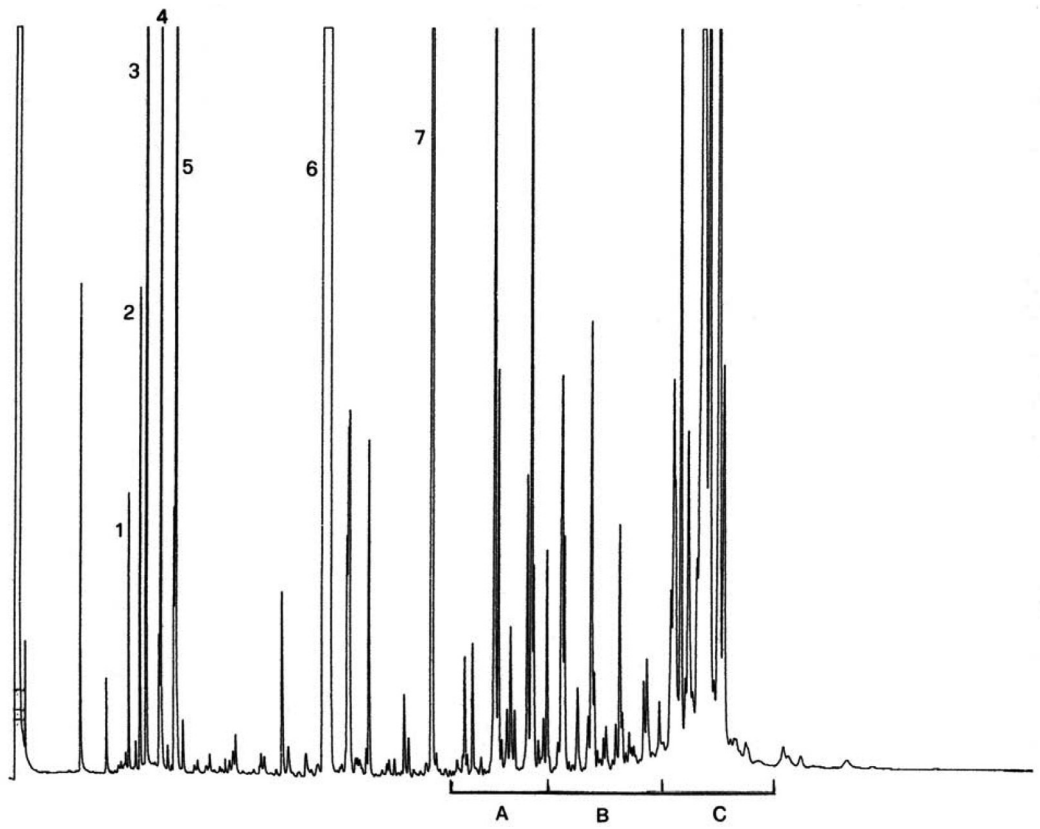
5 = esters $_{46}$

6 = Esters stéroliques et alcools triterpéniques

(*) Après l'élution des esters stéroliques, le chromatogramme ne devrait pas présenter de pics significatifs (triglycérides).

Figure 2

Esters méthyliques, esters éthyliques et cires dans une huile d'olive vierge



Légende:

1 – Méthyl C_{16}

2 – Éthyl C_{16}

3 – Heptadécanoate méthylique I.S.

4 – Méthyl C_{18}

5 – Éthyl C_{18}

6 – Squalene

7 – Arachidate laurique I.S.

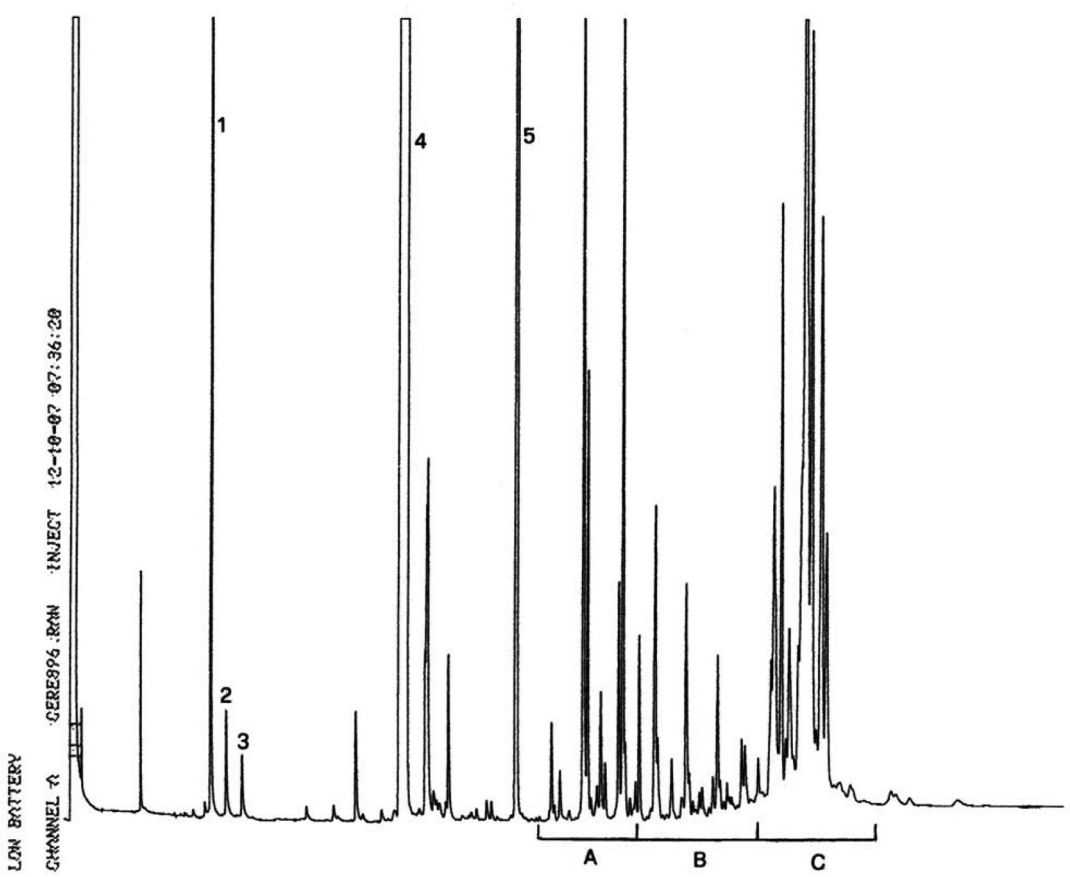
A – Esters diterpéniques

B – Cires

C – Esters stéroliques et esters triterpéniques

Figure 3

Esters méthyliques, esters éthyliques et cires dans une huile d'olive vierge extra



Légende:

1 – Heptadécanoate méthylique I.S.

2 – Méthyl C_{18}

3 – Éthyl C_{18}

4 – Squalène

5 – Arachidate laurique I.S.

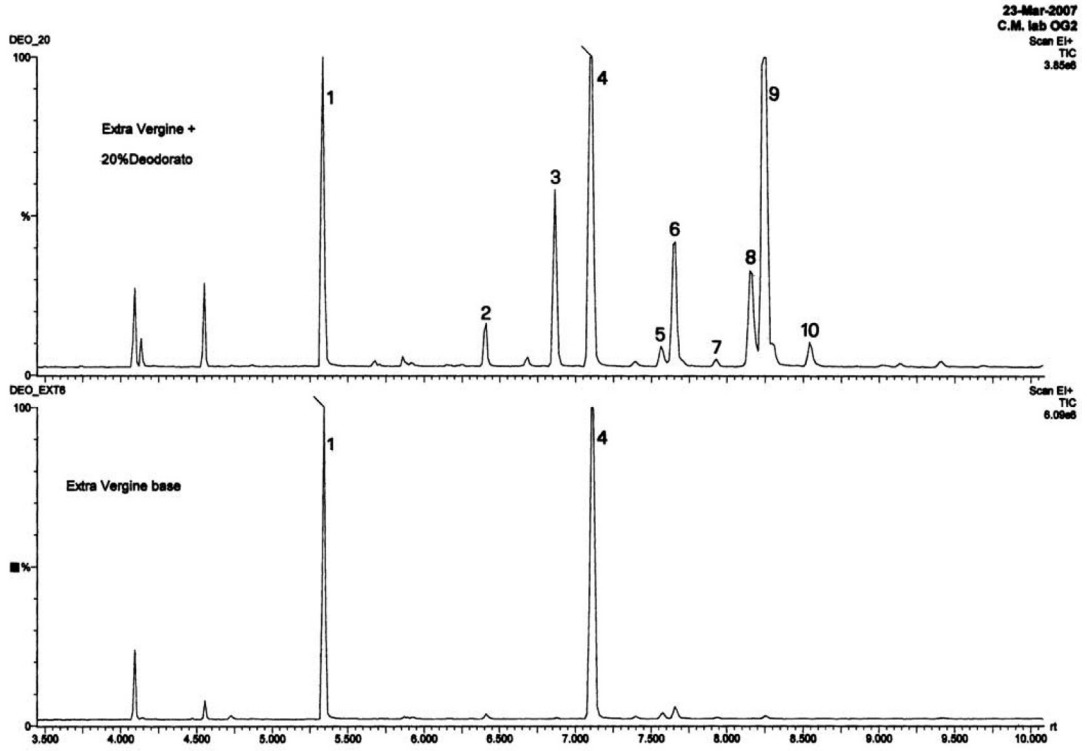
A – Esters diterpéniques

B – Cires

C – Esters stéroliques et esters triterpéniques

Figure 4

Partie d'un chromatogramme d'une huile d'olive vierge extra et de la même huile contenant des pics d'huile désodorisée



Légende:

1 – Myristate méthylique I.S.

2 – Palmitate méthylique

3 – Palmitate éthylique

4 – Heptadécanoate méthylique I.S.

5 – Linoléate méthylique

6 – Oléate méthylique

7 – Stéarate méthylique

8 – Linoléate éthylique

9 – Oléate éthylique

10 – Stéarate éthylique

Appendice A

Détermination de la vitesse linéaire du gaz

Injecter de 1 à 3 µl de méthane (ou propane) dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, après l'avoir réglé sur les conditions opératoires normales. Chronométrer le temps mis par le gaz pour parcourir la colonne, depuis son injection jusqu'à l'apparition du pic (tM).

La vitesse linéaire, en cm/s, est donnée par la formule L/tM, où L est la longueur de la colonne, en centimètres, et tM le temps chronométré en secondes.»