



MÉTHODE D'ANALYSE

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN CIRES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE

1. OBJET

Cette méthode décrit un procédé pour la détermination de la teneur en cires des huiles d'olive. Les cires sont séparées en fonction du nombre d'atomes de carbone. La méthode peut être employée notamment pour différencier l'huile d'olive de pression de celle d'extraction (huile de grignons).

2. PRINCIPE

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

3. MATERIEL

3.1. Erlenmeyer de 25 ml.

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

3.3. Appareil de chromatographie en phase gazeuse approprié pour le fonctionnement avec colonne capillaire, équipé d'un système d'introduction directe dans la colonne, constitué par:

- 3.3.1. Chambre à thermostat pour les colonnes, équipée d'un programmeur de température.**
- 3.3.2. Injecteur à froid** pour introduction directe dans la colonne.
- 3.3.3. Révélateur à ionisation de flamme et convertisseur-amplificateur.**
- 3.3.4. Enregistreur-intégrateur** (*Note 1*) approprié pour le fonctionnement avec le convertisseur-amplificateur (3.3.3.), vitesse de réponse non supérieure à 1 seconde et vitesse de déroulement du papier variable.
- 3.3.5. Colonne capillaire en verre ou silice fondue**, 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 .
- 3.4. Microseringue** pour introduction directe dans la colonne de 10 μl , équipée d'une aiguille cémentée.
- 3.4. Vibreur électrique**
- 3.5. Évaporateur rotatif**
- 3.6. Four à moufle**
- 3.8. Balance analytique** garantissant une précision de la mesure de $\pm 0,1$ mg.
- 3.9.** Verrerie normale de laboratoire.

4. REACTIFS

- 4.1. Gel de silice** d'une granulométrie comprise entre 60 et 200 μm .

Le gel de silice doit être placé dans le four à 500°C pendant au moins 4 heures. Après refroidissement, y ajouter 2% d'eau par rapport à la quantité de gel de silice prélevée. Agiter convenablement afin d'homogénéiser la masse. Conserver à l'obscurité pendant au moins 12 heures avant emploi.

- 4.2. n-hexane**, pour chromatographie.

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, telles 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.

Note 1 : Il est également possible d'utiliser des systèmes informatisés qui prévoient l'acquisition des données de chromatographie en phase gazeuse au moyen d'un PC.

Note 2 : Liquides de répartition adaptés à l'emploi, du type SE52 ou SE 54 dans le commerce.

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. Utiliser avec une aération suffisante. Éviter l'accumulation de vapeurs et éliminer toute cause possible d'incendie, telles 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.

AVERTISSEMENT : inflammable. Nocif par inhalation. Tenir à l'écart de sources de chaleur, étincelles ou flammes nues. Bien fermer les récipients. Éviter l'inhalation prolongée des vapeurs. Éviter le contact prolongé ou répété avec la peau.

4.5. Solution étalon d'arachidate laurique (Note 3), solution à 0,1% (m/V) dans l'hexane (étalon interne).

4.5.1. Soudan 1 (1-phenyl-azo-2-naphthol)

4.6. 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 avec une ventilation adéquate. 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 du soleil ou d'une source de chaleur. Ne pas stocker dans des endroits 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 avec une ventilation adéquate. Ne pas entrer dans les locaux de stockage s'ils ne sont pas bien ventilés. Utiliser exclusivement avec un régulateur 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. Bien rapprocher les bouteilles pour éviter qu'elles ne tombent. S'éloigner du point de sortie du gaz de la bouteille au moment de l'ouverture de la soupape. Éloigner les bouteilles du soleil ou d'une source de chaleur. Ne pas stocker dans des endroits corrosifs. Ne pas utiliser de bouteilles abîmées ou sans étiquette. Ne pas inhaler et utiliser exclusivement à des fins techniques.

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

4.7. Gaz auxiliaires :

- hydrogène pur, pour chromatographie en phase gazeuse ;
- air pur, pour chromatographie en phase gazeuse.

AVERTISSEMENT :

Air : Gaz comprimé sous haute pression. Utiliser avec précaution en présence de substances combustibles car la température d'autoallumage 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 du soleil ou d'une source de chaleur. Ne pas stocker dans des endroits 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 OPERATOIRE

5.1. Préparation de la colonne chromatographique

Suspendre 15 g de gel de silice (4.1.) dans le n-hexane (4.2.) et l'introduire dans la colonne (3.2.). Après tassement spontané, le compléter à l'aide d'un agitateur électrique (3.5.) pour rendre la couche chromatographique plus homogène. Percoler 30 ml de n-hexane afin d'éliminer les impuretés éventuelles. Peser exactement à l'aide de la balance (3.8.) 500 mg de l'échantillon dans l'Erlenmeyer de 25 ml (3.1.), ajouter la quantité appropriée d'étalon interne (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. Transférer l'échantillon ainsi préparé dans la colonne chromatographique à l'aide de deux portions de 2 ml chacune de n-hexane (4.2.).

Laisser s'écouler le solvant jusqu'à 1 mm au-dessus du niveau supérieur de l'absorbant puis percoler 70 ml de n-hexane supplémentaires afin d'éliminer les n-alcane naturellement présents. Commencer alors l'élution chromatographique en recueillant 180 ml du mélange (Note 4/Note 5) n-hexane/éther éthylique, rapport 99:1, tout en respectant un débit d'environ 15 gouttes toutes les 10 secondes. L'élution de l'échantillon doit être effectuée à température ambiante.

La fraction ainsi obtenue est séchée dans l'évaporateur rotatif (3.6.) jusqu'à élimination pratiquement totale du solvant. Les 2 derniers ml du solvant sont éliminés à l'aide d'un faible courant d'azote; ajouter ensuite 2-4 ml de n-heptane.

Note 4 : Le 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 l'échantillon en solution 100µl de soudan à 1% dans le mélange d'élution.

Le colorant ayant une rétention intermédiaire entre les cires et les triglycérides, lorsque la coloration atteint le fonds de la colonne chromatographique, il convient de suspendre l'élution car toutes les cires ont été éluées.

5.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

5.2.1. Opérations préliminaires

Installer la colonne dans le chromatographe en phase gazeuse (3.3), en branchant le terminal d'entrée connecté au système on-column et le terminal de sortie au révélateur. Effectuer les contrôles généraux de l'appareillage de chromatographie en phase gazeuse (tenue des circuits des gaz, efficacité du révélateur et du système d'enregistrement, etc.).

Si la colonne est utilisée pour la première fois, il est recommandé de procéder à son conditionnement. Laisser s'écouler un léger débit de gaz à travers la colonne, puis allumer l'appareillage de chromatographie en phase gazeuse. Chauffer graduellement jusqu'à atteindre, au bout d'environ 4 heures, une température de 350°C. Maintenir cette température pendant au moins 2 heures, puis procéder au réglage de l'appareillage aux conditions de fonctionnement (réglage du débit des gaz, allumage de la flamme, branchement à l'enregistreur électronique (3.3.4.), réglage de la température de la chambre pour la colonne, du révélateur, etc.) et enregistrer le signal à une sensibilité au moins 2 fois supérieure à celle prévue pour l'exécution de l'analyse. Le tracé de la ligne de base doit être linéaire, exempt de pics de toute nature, et ne doit pas présenter de déviation.

Une déviation rectiligne négative indique une tenue imparfaite des connexions de la colonne; une déviation positive indique un conditionnement insuffisant de la colonne.

5.2.2. Choix des conditions opératoires (*Note 6*)

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

- température de la colonne:

20°C/minute 5°C/minute 20°C/minute

au départ 80 °C (1') —————> 240 °C —————> 325 °C (6') —————> 340 °C (10')

- température du révélateur : 350°C ;
- quantité de matière injectée : 1 µl de la solution (2-4 ml de n-heptane) ;
- gaz vecteur : hélium ou hydrogène à la vitesse linéaire optimale pour le gaz sélectionné (voir Appendice A) ;
- sensibilité instrumentale : en mesure de répondre aux conditions ci-dessous :

Ces conditions peuvent être modifiées en fonction des caractéristiques de la colonne et de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse, de manière à obtenir une séparation de toutes les cires, une résolution satisfaisante des pics (voir figure) et un temps de rétention de l'étalon interne C 32 doit être de 18 ± 3 minutes. Le pic des cires le plus représentatif doit avoir mesurer au moins 60% du fond de l'échelle).

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

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

5.3. Exécution de l'analyse

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

Effectuer l'enregistrement jusqu'à élution complète des cires.

La ligne de base doit toujours répondre aux conditions requises.

5.4. Identification des pics

L'identification des différents pics doit être effectuée à partir des temps de rétention et par comparaison avec des mélanges de cires aux temps de rétention connus, analysés dans les mêmes conditions.

La Figure représente un chromatogramme des cires d'une huile d'olive vierge.

5.5. Évaluation quantitative

Procéder au calcul des aires des pics de l'étalon interne et des esters aliphatiques de C40 à C46 à l'aide de l'intégrateur.

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

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

Où :

A_x = aire du pic de chaque ester, en millimètres carrés ;

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

m_s = masse d'étalon interne ajoutée, en milligrammes ;

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

6. EXPRESSION DES RESULTATS

Indiquer la somme des teneurs des différentes cires de C40 à C46 (*Note 7*), en mg/kg de matière grasse (ppm).

Les résultats sont exprimés avec une décimale.

Note 7 : Les composants à quantifier font référence aux pics à nombre de carbone paires compris entre les esters C40 et C46, selon l'exemple de chromatogramme des cires de l'huile d'olive reporté dans la figure ci-après. Si l'ester C46 apparaît en double, il est conseillé, pour l'identifier, d'analyser la fraction des cires d'une huile de grignons d'olive où le pic C46 est facilement identifiable car nettement majoritaire.

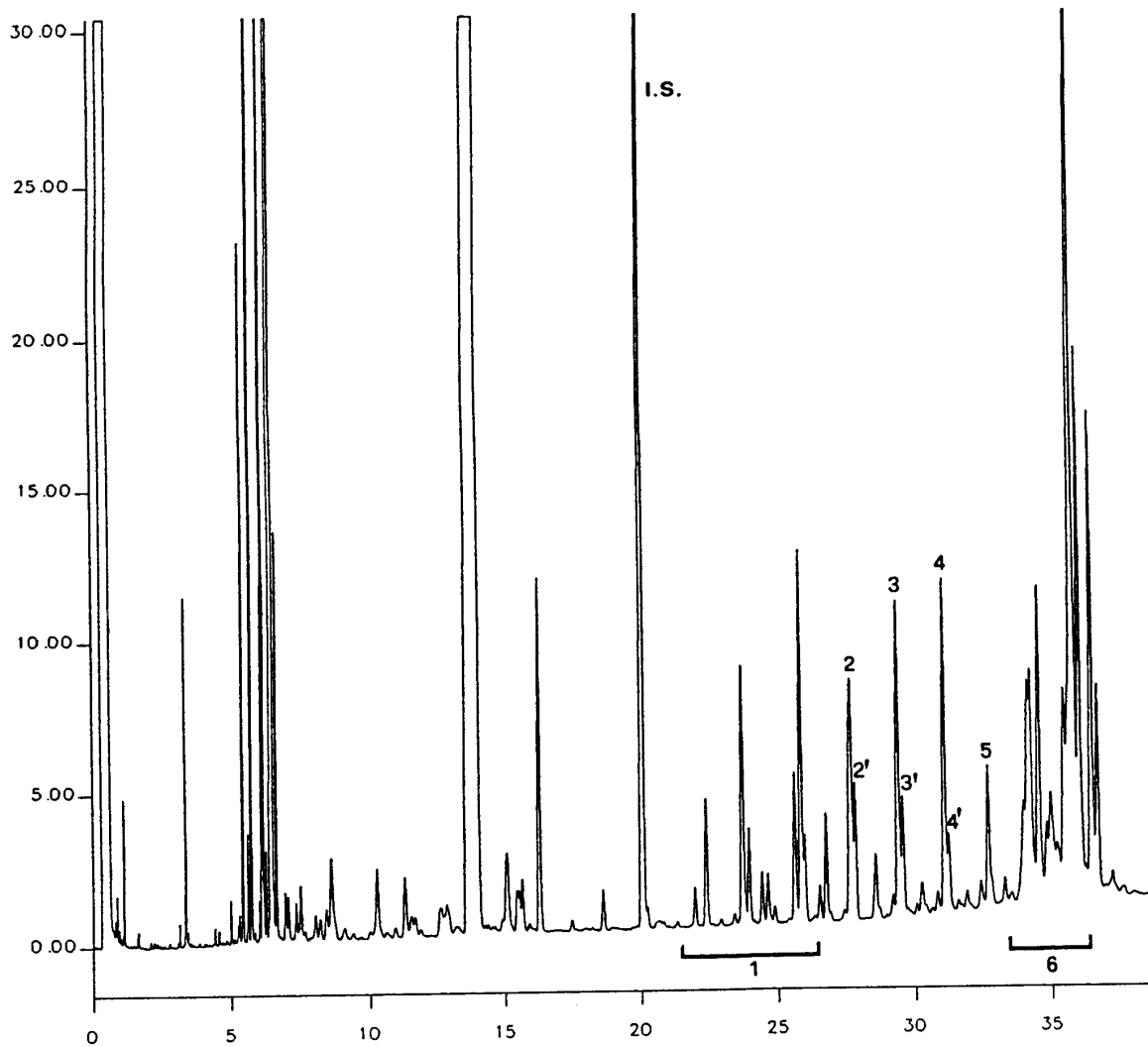


FIGURE : Chromatogramme des cires d'une huile d'olive (*)

Légende :

- I.S. = Arachidate laurique
- 1 = Esters diterpéniques
- 2 + 2' = Esters C40
- 3 + 3' = Esters C42
- 4 + 4' = Esters C44
- 5 = Esters C46
- 6 = Esters stérols et alcool triterpéniques

(*) Après l'élution des esters des stérols, le tracé chromatographique ne doit pas présenter de pics significatifs (triglycérides)

Appendice

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 son réglage aux conditions opératoires normales. Chronométrer le temps employé par le *gaz* pour parcourir la colonne, à partir du moment de son injection jusqu'au moment de la sortie du pic (t_M).

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

MARGES DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE

1. Analyse des résultats de l'essai collaboratif

Les marges de précision de la méthode figurent dans le tableau ci-après.

L'essai collaboratif proposé par le Secrétariat exécutif en 1999 aux laboratoires agréés par le Conseil Oléicole International à cette date, a été réalisé par 19 laboratoires de 8 pays.

L'essai a porté sur cinq échantillons:

- A: huile d'olive vierge extra
- B: huile d'olive vierge + huile de tournesol raffinée
- C: huile d'olive vierge + huile de grignons d'olive raffinée
- D: huile d'olive vierge + huile de soja raffinée + huile de tournesol raffinée
- E: huile d'olive raffinée + huile de grignons d'olive raffinée + huile de soja raffinée + huile d'olive vierge lampante.

L'analyse statistique des résultats de l'essai collaboratif réalisée par le Secrétariat exécutif du Conseil Oléicole International a suivi les règles établies dans les normes ISO 5725 **Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure**; l'examen des valeurs aberrantes a été réalisé par l'application du test de Cochran et du test de Grubbs sur les résultats des laboratoires pour chaque détermination (réplicats a et b) et chaque échantillon.

Le tableau fait état des informations suivantes :

n	Nombre de laboratoires ayant pris part à l'essai
outliers	Nombre de laboratoires aux résultats aberrants
mean	Moyenne des résultats acceptés
r	Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95 % , la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus en appliquant la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans le même laboratoire avec le même opérateur utilisant le même appareillage et pendant un court intervalle de temps
S_r	Écart-type de répétabilité
RSD_r (%)	Coefficient de variation de répétabilité ($S_r \times 100 / \text{mean}$)

- R** Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels obtenus en appliquant la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans des laboratoires différents, avec des opérateurs différents utilisant un appareillage différent
- S_R** Écart-type de reproductibilité
- RSD_R (%)** Coefficient de variation de reproductibilité ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Teneur en cires (mg/kg)

	A	B	C	D	E
n	19	19	19	19	19
outliers	5	5	4	3	5
mean	120.32	123.14	222.41	174.1	345.93
r	9.51	12.56	10.51	12.22	14.91
S_r	3.39	4.48	3.75	4.72	5.32
RSD_r (%)	2.82	3.64	1.69	2.71	1.54
R	38.83	48.89	58.93	25.65	44.39
S_R	13.86	17.46	21.04	9.16	15.85
RSD_R(%)	11.53	14.18	9.46	5.26	4.58

2. Bibliographie

- ISO 5725-1:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 1: Principes généraux et définitions
- ISO 5725-2: 1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée
- ISO 5725-5: 1998 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 5: Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée
- ISO 5725-6:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 6: Utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude