



**PRÉPARATION DES ESTERS MÉTHYLIQUES D'ACIDES GRAS DE L'HUILE
D'OLIVE ET DE L'HUILE DE GRIGNONS D'OLIVE**

Les deux méthodes suivantes sont recommandées pour la préparation des esters méthyliques d'acides gras des huiles d'olive et des huiles de grignons d'olive.

MÉTHODE A : Transestérification à froid au moyen d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium.

MÉTHODE B : Méthylation à chaud au moyen d'une solution méthanolique de méthylate de sodium suivie d'une estérification en milieu acide.

Le choix entre l'une ou l'autre méthode dépendra du paramètre analytique à déterminer et de la catégorie de l'huile, comme indiqué ci-après :

a) Détermination de la différence entre la teneur réelle et la teneur théorique des triglycérides à ECN42 (Δ ECN42)

– La méthode A sera appliquée aux échantillons des huiles de toutes les catégories après purification de l'huile par passage sur une colonne de gel de silice.

b) Détermination de la composition en acides gras

– La méthode A sera appliquée directement aux échantillons d'huiles des catégories suivantes :

- Huile d'olive vierge avec une acidité libre inférieure à 3,3%.
- Huile d'olive raffinée.
- Huile d'olive (coupage d'huile d'olive vierge et d'huile d'olive raffinée).
- Huile de grignons d'olive raffinée.
- Huile de grignons d'olive (coupage d'huile d'olive vierge et d'huile de grignons d'olive raffinée).

- La méthode B sera appliquée directement aux échantillons d’huiles des catégories suivantes :
 - Huile d’olive vierge avec une acidité libre supérieure à 3,3%.
 - Huile de grignons d’olive brute.
- c) Détermination des acides gras des isomères *trans*
- La méthode A sera appliquée directement aux échantillons d’huiles des catégories suivantes :
 - Huile d’olive vierge avec une acidité libre inférieure à 3,3%.
 - Huile d’olive raffinée.
 - Huile d’olive (coupage d’huile d’olive vierge et d’huile d’olive raffinée).
 - Huile de grignons d’olive raffinée.
 - Huile de grignons d’olive (coupage d’huile d’olive vierge et d’huile de grignons d’olive raffinée).
- La méthode A sera appliquée aux échantillons d’huiles des catégories suivantes après purification de l’huile par passage sur une colonne de gel de silice :
 - Huile d’olive vierge avec une acidité libre supérieure à 3,3%.
 - Huile de grignons d’olive brute.

PURIFICATION DES ÉCHANTILLONS D’HUILE

Si nécessaire, les échantillons seront purifiés par passage de l’huile sur une colonne de gel de silice, en utilisant comme solvant d’élution de l’hexane/oxyde diéthylique (87:13, v/v) comme décrit dans la méthode IUPAC 2.507.

Comme procédure alternative, il est possible d’avoir recours à l’extraction en phase solide en utilisant des cartouches de gel de silice. Placer une cartouche de gel de silice (1 g, 6 ml) dans un appareil d’élution à vide et laver avec 6 ml d’hexane. Cesser d’appliquer le vide pour éviter que la colonne ne sèche. Introduire ensuite dans la colonne une solution d’huile (environ 0,12 g) dans 0,5 ml d’hexane et appliquer le vide pour que la solution s’introduise dans la silice, puis éluer avec 10 ml d’hexane/oxyde diéthylique (87:13 v/v) sous vide. Homogénéiser la totalité des éluats et diviser en deux volumes similaires. Faire évaporer un des volumes jusqu’à dessiccation dans un évaporateur rotatif sous pression réduite et à température ambiante. Dissoudre le résidu dans 1 ml d’heptane. La solution obtenue est prête pour l’analyse des acides gras par CPG. Faire évaporer le second volume et dissoudre le résidu dans 1 ml d’acétone pour l’analyse des triglycérides par HPCL si nécessaire.

MÉTHODES POUR LA PRÉPARATION DES ESTERS MÉTHYLIQUES D'ACIDES GRAS

1. MÉTHODE A: **Transestérification à froid au moyen d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium**

1.1. Application

Cette méthode rapide est applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive ayant une teneur en acides gras libres inférieure à 3,3%. Les acides gras libres ne sont pas estérifiés par l'hydroxyde de potassium. Les esters éthyliques d'acides gras se transestérifient plus lentement que les esters glycéridiques et il est possible qu'ils ne se méthylent que partiellement.

1.2. Principe

Les esters méthyliques se forment par transestérification dans une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium comme phase intermédiaire avant la saponification (point 5 de la méthode ISO 5509:2000, point 5 de la méthode IUPAC 2.301).

1.3. Réactifs

Méthanol ne contenant pas plus de 0,5% (m/m) d'eau

Heptane pour chromatographie

Hydroxyde de potassium, solution méthanolique d'environ 2 N : dissoudre 11,2 g d'hydroxyde de potassium dans 100 ml de méthanol

1.4. Matériel

Éprouvettes à bouchon vissant (de 5 ml de capacité) avec un bouchon muni d'un joint de PTFE.

Pipettes graduées ou automatiques de 2 ml et 0,2 ml.

1.5. Mode opératoire

Dans une éprouvette à bouchon vissant de 5 ml, peser environ 0,1 g de l'échantillon d'huile. Ajouter 2 ml d'heptane et agiter. Ajouter 0,2 ml de la solution méthanolique 2 N d'hydroxyde de potassium, boucher à l'aide du bouchon muni d'un joint en PTFE, bien fermer et agiter énergiquement pendant 30 secondes. Laisser reposer jusqu'à ce que la partie supérieure de la solution devienne claire. Décanter la couche supérieure, qui est celle qui contient les esters méthyliques. La solution d'heptane est prête pour l'injection dans le chromatographe. Il est conseillé de maintenir la solution au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse chromatographique. Il n'est pas recommandé de stocker la solution pendant plus de 12 heures.

2. MÉTHODE B: Méthylation à chaud au moyen d'une solution méthanolique de méthylate de sodium suivie d'une estérification en milieu acide

2.1. Application

Cette méthode est applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive ayant une teneur en acides gras libres supérieure à 3,3%.

2.2. Principe

Neutralisation des acides gras libres et méthanolise alcaline des glycérides, suivie d'une estérification des acides gras en milieu acide (point 4.2 de la méthode IUPAC n° 2.301).

2.3. Réactifs

- Heptane pour chromatographie
- Méthanol ne contenant pas plus de 0,05% d'eau (m/m).
- Méthylate de sodium, solution méthanolique 0,2 N: dissoudre 5 g de sodium dans 1.000 ml de méthanol (peut être préparé à partir de solutions commerciales).
- Phénolphaléine, 0,2% solution méthanolique.
- Acide sulfurique, dans la solution méthanolique 1 N : ajouter 3 ml d'acide sulfurique à 96% à 100 ml de méthanol.
- Solution saturée de chlorure de sodium dans l'eau.
-

2.4. Matériel

- Ballon volumétrique de 50 ml de capacité, à fond plat et à col rodé long et étroit
- Réfrigérant à reflux. Réfrigérant à air (de 1 m de long) muni d'un joint rodé
- Régularisateur d'ébullition
- Entonnoir en verre

2.5. Mode opératoire

Verser 0,25 g de l'échantillon d'huile dans un ballon volumétrique muni d'un col rodé de 50 ml. À l'aide de l'entonnoir, ajouter 10 ml de la solution méthanolique 0,2 N de méthylate de sodium et le régularisateur d'ébullition. Adapter le réfrigérant à reflux, agiter et porter à ébullition. La solution doit devenir limpide au bout d'environ 10 minutes. La réaction est pratiquement terminée après 15 minutes. Retirer le ballon de la source de chaleur, attendre l'arrêt du reflux, retirer le réfrigérant et ajouter deux gouttes de la solution de phénolphaléine. Ajouter quelques ml d'acide sulfurique 1 N dans la solution méthanolique jusqu'à ce qu'elle devienne incolore, puis ajouter encore 1 ml en excès. Brancher le réfrigérant et porter de nouveau à ébullition pendant environ 20 minutes. Retirer le ballon de la source de chaleur et le refroidir sous un courant d'eau. Retirer le réfrigérant, ajouter 20 ml de la solution saturée de chlorure de sodium et agiter. Ajouter 5 ml d'heptane, boucher le ballon et agiter énergiquement pendant 15 secondes.

Laisser décanter jusqu'à séparation complète des deux phases. Ajouter de nouveau une partie de la solution saturée de chlorure de sodium jusqu'à ce que la phase aqueuse atteigne la partie inférieure du col du ballon. La couche supérieure qui se trouve dans le col du ballon est celle qui contient les esters méthyliques. La solution obtenue est prête pour l'injection dans le chromatographe en phase gazeuse.

Précaution: La méthylation avec la méthode B doit être réalisée sous hotte ventilée.

2.6. ALTERNATIVES À LA MÉTHYLATION SELON LA MÉTHODE B

2.6.1. MÉTHODE C

2.6.1.1. Principe

La matière grasse soumise à l'analyse est traitée avec une solution méthanolique d'acide chlorhydrique dans une ampoule fermée, à 100°C.

2.6.1.2. Matériel

- Ampoule de verre épais d'une capacité d'environ 5 ml (hauteur 40 à 45 mm, diamètre 14 à 16 mm).
- Pipettes graduées de 1 et 2 ml.

2.6.1.3. Réactifs

Solution d'acide chlorhydrique dans 2% de méthanol, préparée à partir d'acide chlorhydrique gazeux et de méthanol anhydre (Note 1).
Hexane pour chromatographie

2.6.1.4. Mode opératoire

- Verser dans l'ampoule de verre 0,2 g de la matière grasse préalablement séchée au sulfate de sodium et filtrée, puis 2 ml de la solution méthanolique d'acide chlorhydrique. Fermer l'ampoule.
- Submerger l'ampoule à 100°C pendant 40 minutes.
- Faire refroidir l'ampoule sous un courant d'eau, l'ouvrir et ajouter 2 ml d'eau distillée et 1 ml d'hexane.
- Centrifuger et extraire la phase d'hexane, prête à l'emploi.

Note 1: Il est possible d'employer des solutions commerciales de chlorure d'hydrogène dans le méthanol. En laboratoire, il est facile de préparer de petites quantités d'acide chlorhydrique gazeux en modifiant la solution commerciale ($p = 1,18$), par l'ajout de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ($p = 1,84$). Le gaz qui se dégage est simplement séché par barbotage dans de l'acide sulfurique concentré. Le méthanol étant très avide de gaz chlorhydrique, il est bon de prendre toutes les précautions d'usage pour la dissolution (par exemple introduire le gaz à l'aide d'un petit entonnoir renversé qui arrive juste à affleurement du niveau du méthanol). Il est possible de préparer à l'avance des quantités importantes de solutions méthanoliques d'acide chlorhydrique qui se conservent parfaitement à l'obscurité dans des flacons munis de bouchons de verre. Ce réactif peut également être préparé en dissolvant du chlorure d'acétyle dans le méthanol anhydre.

2.6.2. MÉTHODE D

2.6.2.1. Principe

La matière grasse analysée est chauffée à reflux avec du méthanol, de l'hexane et de l'acide sulfurique. Les esters méthyliques obtenus sont extraits à l'éther de pétrole.

2.6.2.2. Matériel

- Tube à essai d'environ 20 ml de capacité avec réfrigérant à reflux d'air d'environ 1 m de long, muni d'un joint rodé.
- Pipette graduée de 5 ml.
- Entonnoir à décantation de 50 ml.
- Éprouvettes de 10 ml et 25 ml.
- Tube à essai à fond conique de 15 ml.

2.6.2.3. Réactifs

- Réactif de méthylation : méthanol anhydre, hexane et acide sulfurique concentré ($p = 1,84$ dans la proportion suivante : 75:25:1 (V/V/V)).
- Éther de pétrole 40-60°C.
- Sulfate de sodium anhydre.

2.6.2.4. Mode opératoire

Introduire dans le tube de 20 ml, 0,1 g d'huile et ajouter 5 ml du réactif de méthylation. Adapter le réfrigérant à reflux et chauffer au bain-marie à ébullition pendant 30 minutes (*Note 2*).

Transférer quantitativement le mélange dans un entonnoir à décantation de 50 ml avec 10 ml d'eau distillée et 10 ml d'éther de pétrole. Agiter vigoureusement et attendre que se produise la séparation des phases. Séparer la phase aqueuse et laver deux fois la couche étherée avec 20 ml d'eau distillée. Ajouter dans l'entonnoir à décantation une petite quantité de sulfate de sodium anhydre, agiter, laisser reposer quelques minutes et filtrer, en recueillant le filtrat dans un tube à fond conique de 15 ml.

Évaporer le solvant au bain-marie dans un courant d'azote.

Note 2: Pour contrôler l'ébullition, introduire une baguette de verre dans le tube et limiter la température du bain-marie à 90°C.

3. Paramètres de précision

L'évaluation statistique de la précision des méthodes A et B a été publiée dans « Grasas y Aceites », Vol. 51, fasc. 6 (2000), par A. Cert, W. Moreda et M.C. Pérez Camino.

L'essai collaboratif a été réalisé par 16 laboratoires de sept pays sur cinq échantillons :

1. Huile d'olive vierge extra (acidité libre 0,18%)
2. Huile d'olive vierge (acidité libre 2,0%)
3. Huile d'olive vierge (acidité libre 3,3%)
4. Huile d'olive (acidité libre 0,88%)
5. Huile de grignons d'olive brute (acidité libre 15,8%)

L'essai collaboratif a été réalisé en suivant les indications données par W. Horwitz (Horwitz, 1988). L'analyse statistique de la répétabilité et de la reproductibilité a été effectuée selon la méthode ISO 5725 (ISO 1986) et la réglementation de la AOAC (AOAC, 1995), qui décrivent les procédures d'identification des valeurs aberrantes et les procédures mathématiques, en utilisant un logiciel mis au point par les auteurs. Pour l'identification des valeurs aberrantes, les tests de Cochran et Grubbs ont été utilisés, déterminant respectivement les laboratoires ayant obtenu des résultats très différents entre les réplicats et ceux aux valeurs extrêmement élevées ou basses.

Les paramètres statistiques suivants ont été utilisés :

- S_r : Écart-type de répétabilité
- r : Répétabilité ($2.8 \sqrt{S_r^2}$)
- RSD_r : Écart-type relatif de répétabilité (coefficient de variation de répétabilité)
- S_R : Écart-type de reproductibilité
- R : Reproductibilité ($2.8 \sqrt{S_R^2}$)
- RSD_R : Écart-type relatif de reproductibilité (coefficient de variation de reproductibilité)
- Ho_R : Rapport de Horwitz $\left[\frac{RSD_R}{RSD_{R_{th}}} \right]$ où $RSD_{R_{th}} = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$, C étant la valeur de la concentration des analytes élevée à la puissance 10.

Tableau 1: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C14:0 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Rés. aberrants	0	1	0	0	1	3	1	0	3	3
Moyenne (%)	0.0090	0.0087	0.0127	0.0138	0.0118	0.0098	0.0100	0.0100	0.0181	0.0296
Répétabilité										
S_r	0.0018	0.0026	0.0026	0.0043	0.0042	0.0034	0.0038	0.0043	0.0020	0.0059
R	0.0051	0.0072	0.0072	0.0121	0.0118	0.0092	0.0106	0.0121	0.0055	0.0165
RSD_r(%)	20	30	20	31	36	37	38	43	11	20
Reproductibilité										
S_R	0.0041	0.0044	0.0059	0.0071	0.0062	0.0060	0.0047	0.0057	0.0058	0.0060
R	0.0114	0.0123	0.0166	0.0200	0.0173	0.0161	0.0133	0.0160	0.0162	0.0168
RSD_R(%)	45	51	47	52	52	64	42	57	32	20
H_{OR}	0.5	0.6	0.5	0.6	0.6	0.7	0.5	0.6	0.4	0.3

S_r : Écart-type de répétabilité; r : Répétabilité; RSD_r : Écart-type relatif de répétabilité; S_R : Écart-type de reproductibilité; R : Reproductibilité; RSD_R : Écart-type relatif de reproductibilité; H_{OR} : Rapport de Horwitz.

Tableau 2: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C16:0 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	16	15	16	15	16	15	15	15	16
Rés. aberrants	2	3	3	4	1	3	0	2	0	4
Moyenne (%)	7.96	8.06	10.32	10.51	10.35	10.62	10.51	10.41	9.67	10.28
Répétabilité										
S_r	0.04	0.09	0.06	0.13	0.15	0.13	0.10	0.08	0.14	0.09
R	0.12	0.26	0.18	0.35	0.42	0.35	0.29	0.22	0.38	0.25
RSD_r(%)	0.53	1.1	0.62	1.2	1.5	1.2	0.98	0.75	1.4	0.87
Reproductibilité										
S_R	0.24	0.14	0.16	0.18	0.33	0.17	0.46	0.42	0.45	0.15
R	0.68	0.40	0.44	0.49	0.93	0.48	1.3	1.2	1.3	0.41
RSD_R(%)	3.0	1.8	1.5	1.7	3.2	1.6	4.4	4.0	4.7	1.4
H_{OR}	0.09	0.05	0.05	0.05	0.10	0.05	0.14	0.13	0.15	0.05

S_r : Écart-type de répétabilité; r : Répétabilité ; RSD_r : Écart-type relatif de répétabilité; S_R : Écart-type de reproductibilité; R : Reproductibilité; RSD_R : Écart-type relatif de reproductibilité; H_{OR} : Rapport de Horwitz.

Tableau 3: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C16:1 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Rés. aberrants	0	1	2	2	0	1	1	1	1	2
Moyenne (%)	0.504	0.501	0.675	0.662	0.735	0.718	0.906	0.870	0.636	0.674
Répétabilité										
S_r	0.014	0.017	0.010	0.027	0.026	0.020	0.012	0.012	0.014	0.018
R	0.041	0.049	0.027	0.077	0.074	0.057	0.034	0.034	0.040	0.050
RSD_r(%)	2.9	3.5	1.4	4.1	3.6	2.8	1.3	1.4	2.3	2.7
Reproductibilité										
S_R	0.034	0.034	0.027	0.047	0.047	0.044	0.44	0.057	0.046	0.049
R	0.966	0.095	0.077	0.131	0.132	0.122	0.123	0.159	0.128	0.138
RSD_R(%)	6.8	6.8	4.1	7.0	6.4	6.1	4.9	6.5	7.2	7.3
H_{OR}	0.14	0.14	0.08	0.15	0.13	0.13	0.11	0.14	0.15	0.15

S_r: Écart-type de répétabilité; *r*: Répétabilité ; *RSD_r*: Écart-type relatif de répétabilité; *S_R*: Écart-type de reproductibilité; *R*: Reproductibilité; *RSD_R*: Écart-type relatif de reproductibilité; *H_{OR}*: Rapport de Horwitz.

Tableau 4: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C18:0 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Rés. aberrants	2	1	0	1	0	1	0	0	1	0
Moyenne (%)	2.883	2.871	2.490	2.508	2.618	2.676	3.492	3.495	3.118	3.256
Répétabilité										
S_r	0.032	0.018	0.012	0.017	0.030	0.027	0.034	0.035	0.038	0.047
R	0.089	0.049	0.034	0.047	0.084	0.075	0.094	0.972	0.107	0.133
RSD_r(%)	1.1	0.61	0.49	0.66	1.1	1.0	0.96	0.99	1.2	1.5
Reproductibilité										
S_R	0.061	0.110	0.092	0.109	0.088	0.106	0.131	0.147	0.117	0.128
R	0.171	0.308	0.259	0.306	0.246	0.297	0.367	0.411	0.328	0.358
RSD_R(%)	2.1	3.8	3.7	4.4	3.4	4.0	3.8	4.2	3.8	3.9
H_{OR}	0.05	0.10	0.09	0.11	0.09	0.10	0.10	0.11	0.10	0.10

S_r: Écart-type de répétabilité; *r*: Répétabilité; *RSD_r*: Écart-type relatif de répétabilité; *S_R*: Écart-type de reproductibilité; *R*: Reproductibilité; *RSD_R*: Écart-type relatif de reproductibilité; *H_{OR}*: Rapport de Horwitz.

Tableau 5: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C18:1 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Rés. aberrants	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
Moyenne (%)	79.42	79.39	74.55	74.56	75.55	75.41	76.14	76.22	75.80	75.02
Répétabilité										
S_r	0.15	0.10	0.11	0.16	0.14	0.14	0.08	0.14	0.16	0.11
R	0.42	0.29	0.30	0.45	0.39	0.40	0.23	0.40	0.46	0.32
RSD_r(%)	0.19	0.13	0.15	0.21	0.19	0.19	0.11	0.19	0.21	0.15
Reproductibilité										
S_R	0.49	0.42	0.45	0.49	0.45	0.48	0.47	0.48	0.64	0.57
R	1.37	1.18	1.26	1.37	1.26	1.34	1.33	1.33	1.80	1.58
RSD_R(%)	0.61	0.53	0.61	0.66	0.60	0.63	0.62	0.63	0.85	0.75
H_{OR}	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03

S_r : Écart-type de répétabilité; r : Répétabilité; RSD_r : Écart-type relatif de répétabilité; S_R : Écart-type de reproductibilité; R : Reproductibilité; RSD_R : Écart-type relatif de reproductibilité; H_{OR} : Rapport de Horwitz.

Tableau 6: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C18:2 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Rés. aberrants	2	2	1	2	0	1	1	1	0	1
Moyenne (%)	7.33	7.25	9.66	9.60	8.52	8.44	7.18	7.12	8.75	8.85
Répétabilité										
S_r	0.02	0.04	0.03	0.06	0.06	0.08	0.04	0.04	0.05	0.04
R	0.07	0.12	0.08	0.16	0.17	0.21	0.12	0.11	0.13	0.10
RSD_r(%)	0.33	0.58	0.28	0.59	0.70	0.90	0.62	0.56	0.55	0.41
Reproductibilité										
S_R	0.12	0.17	0.19	0.20	0.18	0.19	0.16	0.12	0.21	0.17
R	0.34	0.47	0.52	0.55	0.50	0.52	0.45	0.33	0.59	0.48
RSD_R(%)	1.7	2.3	1.9	2.0	2.1	2.2	2.2	1.6	2.4	1.9
H_{OR}	0.05	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.05	0.07	0.06

S_r: Écart-type de répétabilité; *r*: Répétabilité; *RSD_r*: Écart-type relatif de répétabilité; *S_R*: Écart-type de reproductibilité; *R*: Reproductibilité; *RSD_R*: Écart-type relatif de reproductibilité; *H_{OR}*: Rapport de Horwitz.

Tableau 7: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C18:3 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Rés. aberrants	2	1	0	2	0	0	0	1	4	1
Moyenne (%)	0.730	0.719	0.896	0.876	0.860	0.834	0.744	0.720	0.753	0.852
Répétabilité										
S_r	0.013	0.012	0.017	0.013	0.010	0.015	0.014	0.010	0.020	0.018
R	0.036	0.025	0.049	0.037	0.029	0.042	0.039	0.029	0.055	0.051
RSD_r(%)	1.8	1.7	1.9	1.5	1.2	1.8	1.9	1.4	2.6	2.2
Reproductibilité										
S_R	0.029	0.032	0.041	0.039	0.036	0.043	0.028	0.030	0.041	0.035
R	0.080	0.089	0.116	0.110	0.101	0.120	0.079	0.083	0.115	0.097
RSD_R(%)	3.9	4.4	4.6	4.5	4.2	5.2	3.8	4.1	5.4	4.1
H_{OR}	0.08	0.09	0.10	0.10	0.09	0.11	0.08	0.09	0.12	0.09

S_r : Écart-type de répétabilité; r : Répétabilité; RSD_r : Écart-type relatif de répétabilité; S_R : Écart-type de reproductibilité; R : Reproductibilité; RSD_R : Écart-type relatif de reproductibilité; H_{OR} : Rapport de Horwitz.

Tableau 8: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C20:0 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Rés. aberrants	1	1	0	1	0	1	1	1	0	4
Moyenne (%)	0.394	0.405	0.441	0.465	0.440	0.464	0.424	0.423	0.425	0.429
Répétabilité										
S_r	0.015	0.016	0.018	0.015	0.013	0.017	0.013	0.013	0.019	0.013
R	0.041	0.044	0.050	0.042	0.037	0.047	0.037	0.037	0.053	0.038
RSD_r(%)	3.8	3.9	4.0	3.2	3.0	3.7	3.1	3.1	4.4	3.1
Reproductibilité										
S_R	0.029	0.037	0.032	0.041	0.031	0.039	0.042	0.038	0.036	0.028
R	0.080	0.104	0.089	0.114	0.086	0.108	0.117	0.107	0.102	0.080
RSD_R(%)	7.3	9.1	7.2	8.8	7.0	8.4	9.8	9.0	8.6	6.6
H_{OR}	0.14	0.18	0.14	0.17	0.14	0.16	0.19	0.18	0.17	0.13

S_r: Écart-type de répétabilité; *r*: Répétabilité; *RSD_r*: Écart-type relatif de répétabilité; *S_R*: Écart-type de reproductibilité; *R*: Reproductibilité; *RSD_R*: Écart-type relatif de reproductibilité; *H_{OR}*: Rapport de Horwitz.

Tableau 9: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C20:1 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Rés. aberrants	1	1	1	0	1	2	0	1	1	4
Moyenne (%)	0.372	0.375	0.388	0.400	0.370	0.379	0.280	0.284	0.296	0.298
Répétabilité										
S_r	0.009	0.013	0.011	0.016	0.013	0.009	0.017	0.011	0.026	0.013
R	0.026	0.038	0.032	0.046	0.036	0.024	0.047	0.032	0.073	0.037
RSD_r(%)	7.8	3.6	3.0	4.1	3.5	2.3	6.0	4.0	8.9	4.4
Reproductibilité										
S_R	0.029	0.032	0.034	0.032	0.023	0.027	0.028	0.024	0.027	0.016
R	0.082	0.091	0.095	0.091	0.064	0.077	0.079	0.069	0.077	0.045
RSD_R(%)	7.9	8.7	8.7	8.1	6.2	7.2	10	8.6	9.3	5.4
Ho_R	0.15	0.17	0.17	0.16	0.12	0.14	0.18	0.16	0.17	0.10

S_r : Écart-type de répétabilité; r : Répétabilité; RSD_r : Écart-type relatif de répétabilité; S_R : Écart-type de reproductibilité; R : Reproductibilité; RSD_R : Écart-type relatif de reproductibilité; Ho_R : Rapport de Horwitz.

Tableau 10: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C 22:0 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Rés. aberrants	0	1	1	0	1	1	1	1	3	2
Moyenne (%)	0.111	0.114	0.135	0.141	0.135	0.143	0.116	0.114	0.185	0.205
Répétabilité										
S_r	0.008	0.011	0.013	0.008	0.014	0.008	0.016	0.010	0.013	0.015
R	0.022	0.032	0.036	0.022	0.039	0.021	0.045	0.029	0.036	0.041
RSD_r(%)	7.0	9.9	9.6	5.5	10	5.3	14	9.0	6.9	7.2
Reproductibilité										
S_R	0.014	0.014	0.016	0.020	0.018	0.018	0.020	0.017	0.015	0.024
R	0.038	0.039	0.044	0.056	0.050	0.050	0.056	0.047	0.043	0.067
RSD_R(%)	12	12	12	14	13	12	17	15	8.3	12
Ho_R	0.19	0.20	0.19	0.23	0.22	0.20	0.27	0.23	0.14	0.20

S_r : Écart-type de répétabilité; r : Répétabilité; RSD_r : Écart-type relatif de répétabilité; S_R : Écart-type de reproductibilité; R : Reproductibilité; RSD_R : Écart-type relatif de reproductibilité; Ho_R : Rapport de Horwitz.

Tableau 11: Paramètres statistiques relatifs à la détermination de l'acide C 24:0 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Rés. aberrants	1	1	0	2	0	2	0	2	3	3
Moyenne (%)	0.040	0.047	0.062	0.076	0.058	0.075	0.049	0.056	0.075	0.125
Répétabilité										
S_r	0.006	0.014	0.005	0.004	0.012	0.010	0.012	0.006	0.014	0.013
R	0.017	0.039	0.0153	0.012	0.033	0.029	0.033	0.017	0.040	0.036
RSD_r(%)	15	30	8.9	5.6	20	14	24	11	19	10
Reproductibilité										
S_R	0.020	0.021	0.026	0.014	0.026	0.016	0.019	0.015	0.014	0.024
R	0.055	0.059	0.073	0.040	0.072	0.045	0.054	0.043	0.040	0.068
RSD_R(%)	49	44	42	19	45	21	39	27	19	19
Ho_R	0.67	0.62	0.61	0.28	0.64	0.32	0.55	0.39	0.29	0.31

S_r: Écart-type de répétabilité; r: Répétabilité ; RSD_r: Écart-type relatif de répétabilité; S_R: Écart-type de reproductibilité; R: Reproductibilité; RSD_R: Écart-type relatif de reproductibilité; Ho_R: Rapport de Horwitz.

Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Rés. aberrants	1	2	1	1	1	1	1	3	2	1
Moyenne (%)	0.0100	0.0115	0.0114	0.0129	0.0107	0.0114	0.0127	0.0117	0.1173	0.0961
Répétabilité										
S_r	0.0038	0.0078	0.0046	0.0027	0.0027	0.0046	0.0045	0.0050	0.0158	0.0109
R	0.0106	0.0220	0.0130	0.0075	0.0075	0.0130	0.0125	0.0140	0.0443	0.0304
RSD_r(%)	38	68	41	21	25	41	35	43	13	11
Reproductibilité										
S_R	0.0096	0.0097	0.0098	0.0103	0.0107	0.0106	0.0113	0.0088	0.0559	0.0270
R	0.0268	0.0273	0.0276	0.0289	0.0300	0.0297	0.0316	0.0247	0.1566	0.0756
RSD_R(%)	96	84	86	80	100	93	89	76	48	28
H_{OR}	1.1	0.95	0.97	0.92	1.1	1.1	1.0	0.85	0.76	0.44

S_r : Écart-type de répétabilité; r : Répétabilité; RSD_r : Écart-type relatif de répétabilité; S_R : Écart-type de reproductibilité; R : Reproductibilité; RSD_R : Écart-type relatif de reproductibilité; H_{OR} : Rapport de Horwitz.

Tableau 13: Paramètres statistiques relatifs à la détermination des acides <i>trans</i> -C18:2 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Rés. aberrants	1	2	0	1	2	1	2	1	0	1
Moyenne (%)	0.0061	0.0058	0.0111	0.0096	0.0081	0.0089	0.0073	0.0086	0.0133	0.0129
Répétabilité										
S_r	0.0042	0.0034	0.0050	0.0019	0.0020	0.0019	0.0020	0.0053	0.0045	0.0038
r	0.0118	0.0095	0.0140	0.0053	0.0055	0.0053	0.0055	0.0150	0.0125	0.0129
RSD_r(%)	70	59	45	20	24	21	27	62	34	29
Reproductibilité										
S_R	0.0064	0.0051	0.0079	0.0076	0.0058	0.0085	0.0068	0.0086	0.0120	0.0099
R	0.0178	0.0143	0.0223	0.0212	0.0162	0.0237	0.0190	0.0240	0.0337	0.0278
RSD_R(%)	105	88	72	79	71	95	93	100	90	77
H_{OR}	1.1	0.90	0.81	0.86	0.76	1.0	0.98	1.1	1.0	0.89

S_r : Écart-type de répétabilité; r : Répétabilité; RSD_r : Écart-type relatif de répétabilité; S_R : Écart-type de reproductibilité; R : Reproductibilité; RSD_R : Écart-type relatif de reproductibilité; H_{OR} : Rapport de Horwitz.

Tableau 14: Paramètres statistiques relatifs à la détermination des acides <i>trans</i> C18:2+ <i>trans</i> -C18:3 dans les huiles d'olive et de grignons d'olive										
Échantillon	Vierge extra		Vierge		Lampante		Huile d'olive		Huile de grignons d'olive brute	
Méthode	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide	KOH dans le méthanol	Méthylation de base + acide
Participants	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Rés. aberrants	3	3	3	3	4	2	2	2	3	1
Moyenne (%)	0.0054	0.0054	0.0100	0.0088	0.0077	0.0092	0.0088	0.0081	0.0254	0.0186
Répétabilité										
S_r	0.0046	0.0035	0.0050	0.0046	0.0021	0.0028	0.0102	0.0044	0.0061	0.0038
R	0.0128	0.0099	0.0140	0.0128	0.0060	0.0078	0.0285	0.0123	0.0171	0.0106
<i>RSD_r</i> (%)	84	65	50	52	28	30	115	54	24	20
Reproductibilité										
S_R	0.0067	0.0051	0.0079	0.0069	0.0063	0.0095	0.0115	0.0086	0.0211	0.0151
R	0.0186	0.0144	0.0221	0.0193	0.0175	0.0267	0.0321	0.0241	0.0590	0.0423
<i>RSD_R</i> (%)	123	95	79	79	81	103	130	117	83	81
<i>Ho_R</i>	1.2	0.96	0.87	0.85	0.86	1.1	1.4	1.1	1.1	0.99

S_r : Écart-type de répétabilité; r : Répétabilité ; *RSD_r*: Écart-type relatif de répétabilité; S_R : Écart-type de reproductibilité; **R**: Reproductibilité; *RSD_R*: Écart-type relatif de reproductibilité; *Ho_R*: Rapport de Horwitz

RECOMMANDATIONS POUR L'ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ESTERS D'ACIDES GRAS DE L'HUILE D'OLIVE ET DE L'HUILE DE GRIGNONS D'OLIVE

1. Mode opératoire

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de dissolutions d'esters gras dans l'hexane sera réalisée conformément à la norme ISO 5508, au moyen d'une colonne capillaire (50 m de long x 0,25 ou 0,32 mm de diamètre interne) recouverte de cyanopropylsilicone, tel qu'indiqué pour la détermination des acides gras isomères *trans* (COI/T.20/Doc. n° 17).

La Figure 1 présente le profil chromatographique typique d'une huile de grignons d'olive contenant des esters méthyliques et éthyliques d'acides gras et des isomères *trans* d'esters méthyliques.

2. Calculs

2.1. Pour calculer la composition en acides gras et le Δ ECN42, les acides gras suivants doivent être pris en compte:

Myristique (C14:0)

Palmitique (C16:0). Somme des aires des pics correspondant aux esters méthyliques et éthyliques.

Palmitoléique (C16:1). Somme des aires des pics correspondant aux isomères ω 9 et ω 7 de l'ester méthylique.

Heptadécanoïque (C17:0).

Heptadécénoïque (C17:1).

Stéarique (C18:0).

Oléique (C18:1). Somme des aires des pics correspondant aux isomères ω 9 et ω 7 de l'ester méthylique, de l'ester éthylique et des isomères *trans* de l'ester méthylique.

Linoléique (C18:2). Somme des aires des pics correspondant aux esters méthyliques et éthyliques et aux isomères *trans* de l'ester méthylique.

Arachidique (C20:0).

Linoléinique (C18:3). Somme des aires de l'ester méthylique et des isomères *trans* de l'ester méthylique.

Eïcosénoïque (C20:1)

Béhénique (C22:0)

Lignocérique (C24:0)

Le squalène n'est pas pris en compte pour le calcul de l'aire totale.

2.2. Pour calculer le pourcentage de *trans*-C18:1, on utilisera le pic correspondant aux esters méthyliques de cet acide gras. Pour la somme [*trans*-C18:2 + *trans*-C18:3], on additionnera tous les pics correspondant aux isomères *trans* de ces deux acides gras. Pour calculer l'aire totale, on tiendra compte de tous les pics mentionnées en 2.1. (voir COI/T.20/Doc. n° 17).

Le calcul du pourcentage de chaque acide gras sera effectué conformément à la formule suivante :

$$\%X = (\text{Aire } X \times 100) / (\text{aire totale})$$

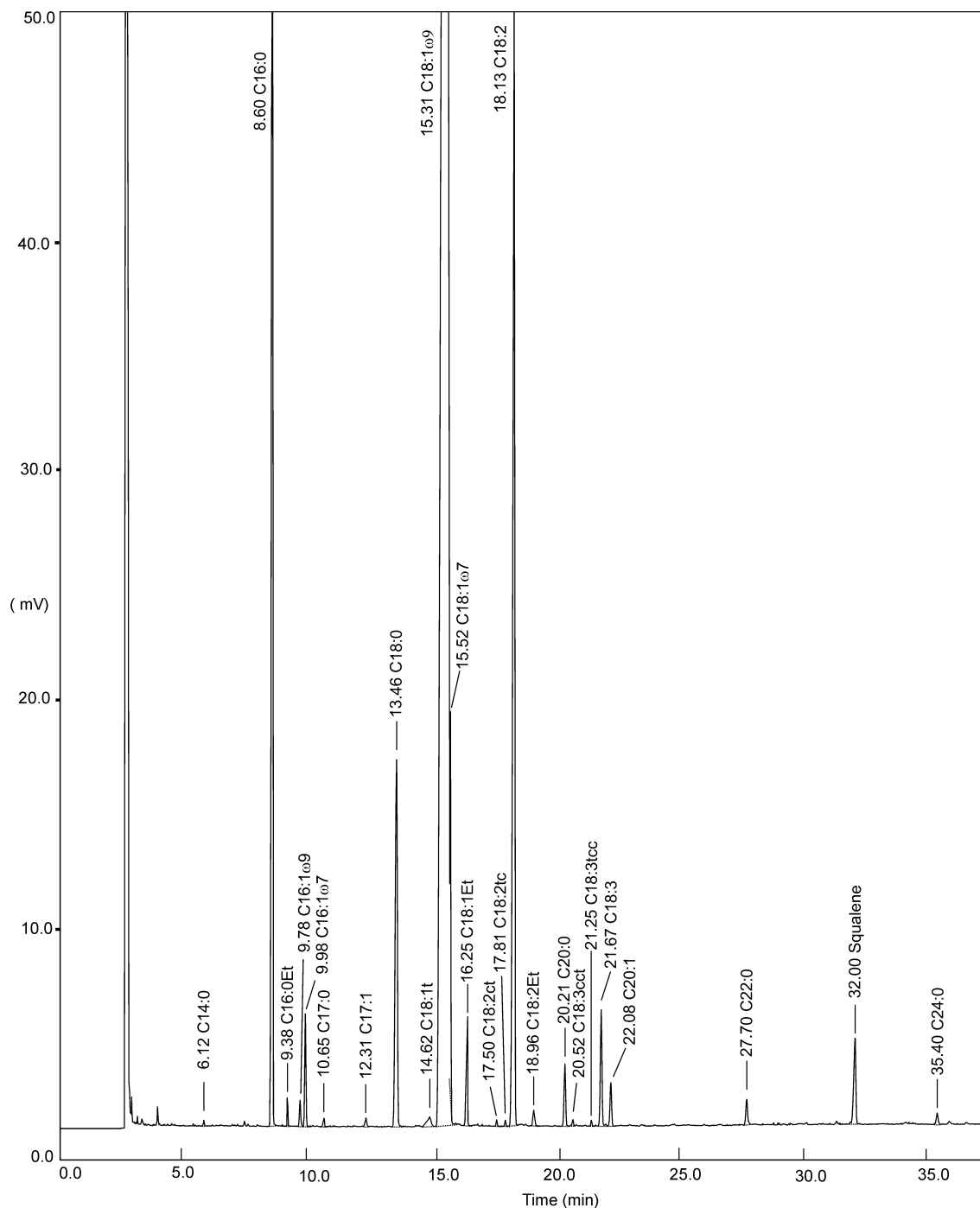


Figure 1: Profil chromatographique d'une huile de grignons d'olive, obtenu avec la méthode de méthylation à froid. Les pics chromatographiques correspondent aux esters méthyliques, sauf indication contraire.