



MÉTHODE D'ANALYSE

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN CIRES ET EN ESTERS MÉTHYLIQUES ET ÉTHYLIQUES DES ACIDES GRAS PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE SUR COLONNE CAPILLAIRE

1. OBJET

Cette méthode décrit un procédé pour la détermination de la teneur en cires, en esters méthyliques et éthyliques des 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 pression de celle d'extraction (huile de grignons) et comme paramètre de qualité pour les huiles d'olive vierges extra, dans la mesure où elle permet de différencier les huiles d'olive vierges des huiles d'olive raffinées. Elle peut également faciliter la détection des mélanges frauduleux d'huiles d'olive vierge extra avec des huiles de qualité inférieure, notamment les huiles d'olive vierges, courantes, lampantes ou désodorisées.

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. MATÉRIEL

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 des éléments suivants :

- 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 fonctionner 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 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 .
- 3.4. **Microseringue** de 10 μl , équipée d'une aiguille cémentée, pour introduction directe dans la colonne.
- 3.5. **Vibrateur électrique.**
- 3.6. **Évaporateur rotatif.**
- 3.7. **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. **RÉACTIFS**

- 4.1. **Gel de silice**, d'une granulométrie comprise entre 60 et 200 μm mesh. Le gel de silice doit être placé dans le four 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 masse. Conserver à l'obscurité pendant au moins 12 heures avant emploi.

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 PC.

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

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), solution à 0,05 % (m/V) dans l'heptane (étalon interne pour cires).

4.6. Solution étalon de heptadécanoate méthylique, à 0,02 % (m/V) dans 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.

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

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

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, utiliser 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 et 0,05 mg de heptadécanoate méthylique dans le cas des huiles d'olive.

Introduire l'échantillon ainsi préparé dans la colonne chromatographique à l'aide de deux fractions 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 et percoler 35 ml de n-hexane/éther éthylique, rapport 99 :1, tout en respectant un débit d'environ 15 gouttes toutes les 10 secondes. (**Cette fraction contient les esters méthyliques et éthyliques et les cires**).

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. Prélever la fraction contenant les esters méthyliques et éthyliques est diluée avec 2 à 4 ml de n-heptane ou de iso-octane.

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, fonctionnement du révélateur et du système d'enregistrement, etc.).

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, il convient de suspendre l'élution lorsque la coloration atteint le fond de la colonne chromatographique, car toutes les cires ont été éluées.

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 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 pour les cires et les esters éthyliques et méthyliques (Note 6)

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

- température de la colonne :

80°C au départ (1') $\xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{min}}$ 140°C $\xrightarrow{5^\circ\text{C}/\text{min}}$ 335°C (20)

- température du révélateur : 350°C.
- quantité de matière injectée : 1 µl de la solution de n-heptane (2-4 ml).
- 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-dessus.

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 et des esters éthyliques et méthyliques des acides gras, une résolution satisfaisante des pics (voir figures 2, 3 et 4) et un temps de rétention de l'étalon interne arachidate laurique de 18 + 3 minutes. Le pic des cires le plus représentatif doit être supérieur à 60 % du fond de l'échelle alors que l'étalon interne heptadécanoate méthylique des esters méthyliques et éthyliques doit atteindre la totalité 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.

- 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-dessus.

5.3. Exécution de l'analyse

Prélever 10 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 ou des stigmastadiènes, selon la fraction analysée.

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. Les alkyl esters sont identifiés à partir de mélanges d'esters méthyliques et éthyliques des principaux acides gras de 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 vendues dans le commerce, l'une contenant des esters méthyliques et éthyliques et l'autre

non. La figure 4 représente les chromatogrammes d'une huile d'olive vierge extra de qualité optimale et de la même huile contenant 20 % d'huile désodorisée.

5.5. Évaluation quantitative des cires

Procéder au calcul des aires des pics de l'étalon interne arachidate laurique 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 :

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

où :

- A_x = aire du pic de chaque ester, en millimètres carrés
- A_s = aire du pic de l'étalon interne arachidate laurique, en millimètres carrés
- m_s = masse de l'étalon interne arachidate laurique ajoutée, en milligrammes
- m = masse de l'échantillon prélevé pour la détermination, en grammes.

5.5.1 Évaluation quantitative des esters méthyliques et éthyliques

Procéder au calcul des aires des pics de l'étalon interne heptadécanoate méthylique et des esters méthyliques des acides gras C16 et C18 et des esters éthyliques des acides gras C16 et C18 à l'aide de l'intégrateur.

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

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

où :

- A_x = aire du pic de chaque ester C16 et C18, en millimètres carrés
- A_s = aire du pic de l'étalon interne heptadécanoate méthylique, en millimètres carrés
- m_s = masse de l'étalon interne heptadécanoate méthylique ajoutée, en milligrammes
- m = masse de l'échantillon prélevé pour la détermination, en grammes.

6. **EXPRESSION DES RÉSULTATS**

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

Indiquer la somme des teneurs des esters méthyliques et éthyliques de C16 à C18 et le total des deux.

Les résultats sont exprimés avec une décimale.

Indiquer la teneur des stigmastadiènes en mg/kg.

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.

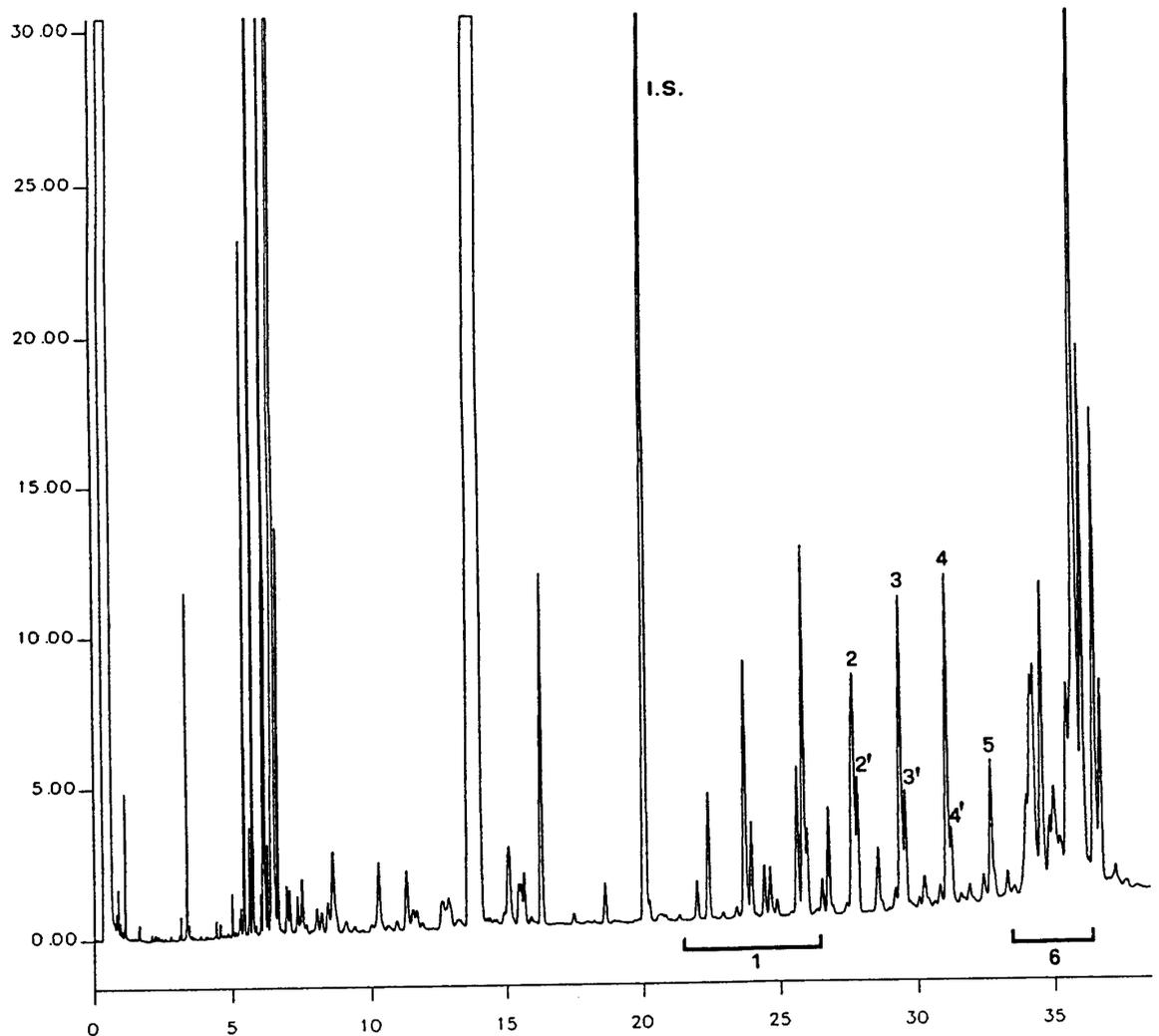


Figure 1 : Chromatogramme des cires d'une huile d'olive (*).

Légende :

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

I.S. Arachidate laurique

1 = Esters diterpéniques

2+2' = esters C40

3+3' = esters C42

4+4' = esters C44

4 = esters 46

6 = Esters stéroliques et alcools triterpéniques

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

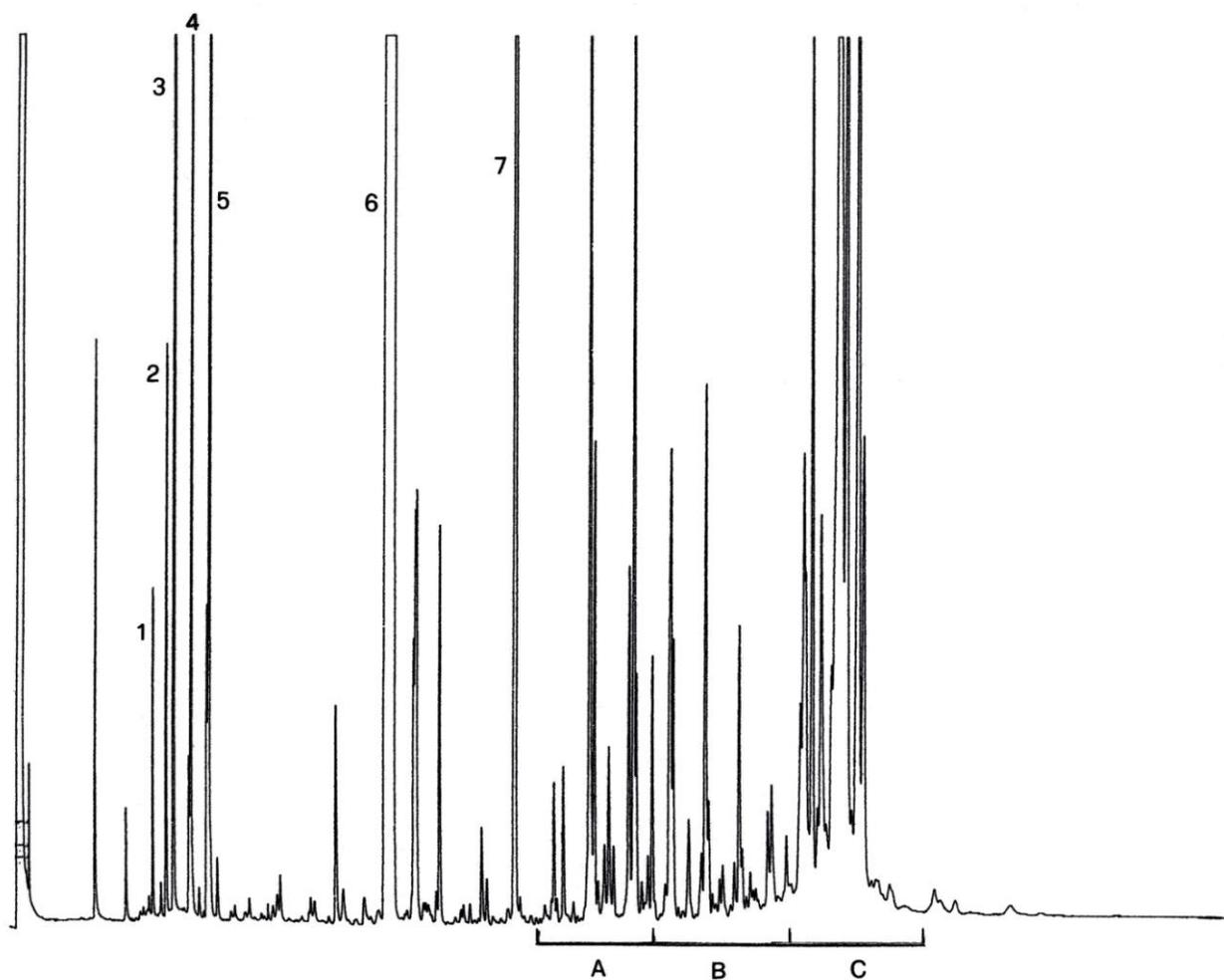


Figure 2 – Esters méthyliques, esters éthyliques et cires dans une **huile d'olive vierge**.

Légende :

1 – Méthyl C16

2 – Éthyl C16

3 – Heptadécanoate méthylique I.S.

4 – Méthyl C18

5 – Éthyl C18

6 – Squalène

7 – Arachidate laurique I.S.

A – Esters diterpéniques

B – Cires

C – Esters stéroliques et esters triterpéniques

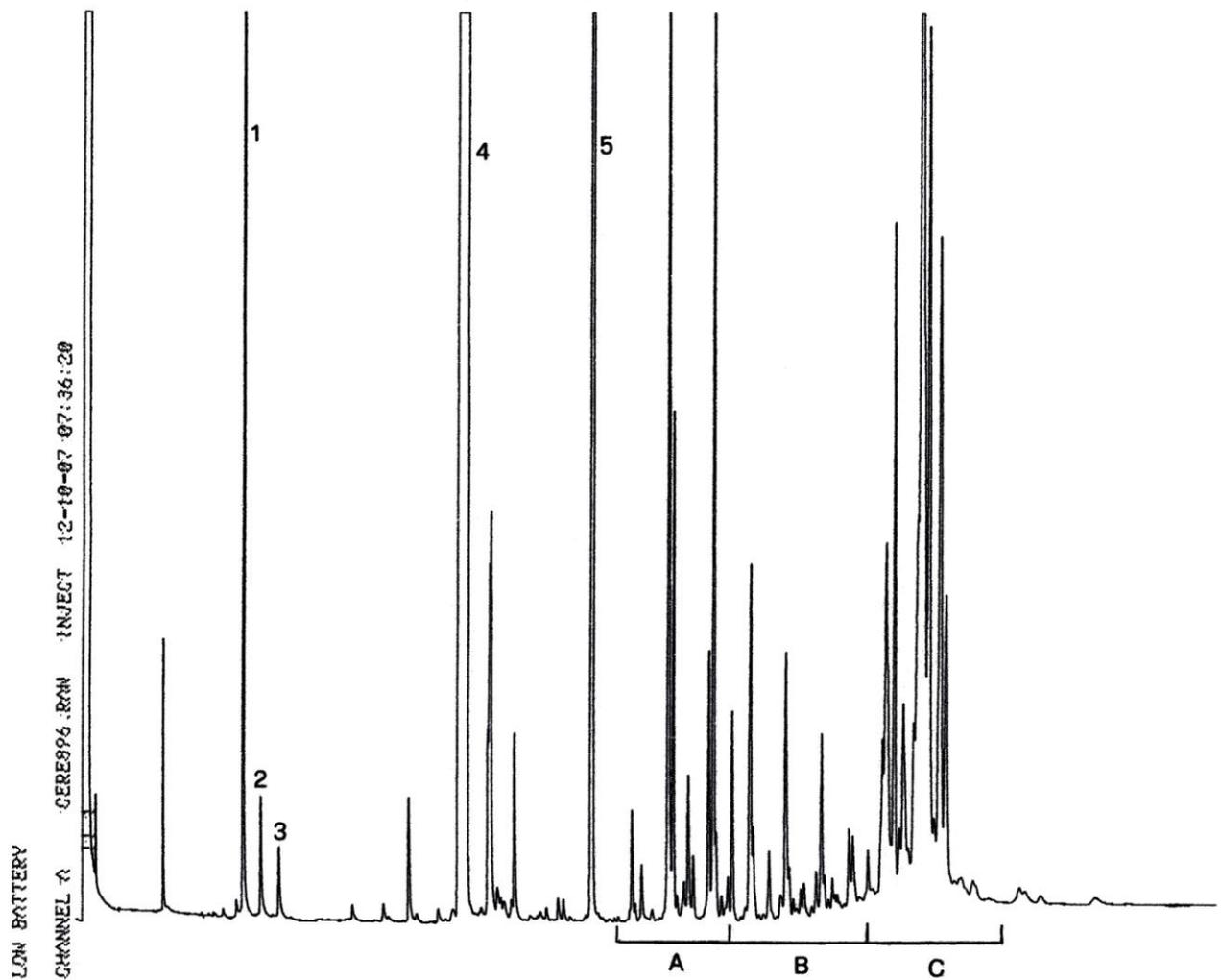


Figure 3 – Esters méthyliques, esters éthyliques et cires dans une **huile d'olive vierge extra**.

Légende :

- 1 – Heptadécanoate méthylique I.S.
- 2 – Méthyl C18
- 3 – Éthyl C18
- 4 – Squalène
- 5 – Arachidate laurique I.S.

- A – Esters diterpéniques
- B – Cires
- C – Esters stéroliques et esters triterpéniques

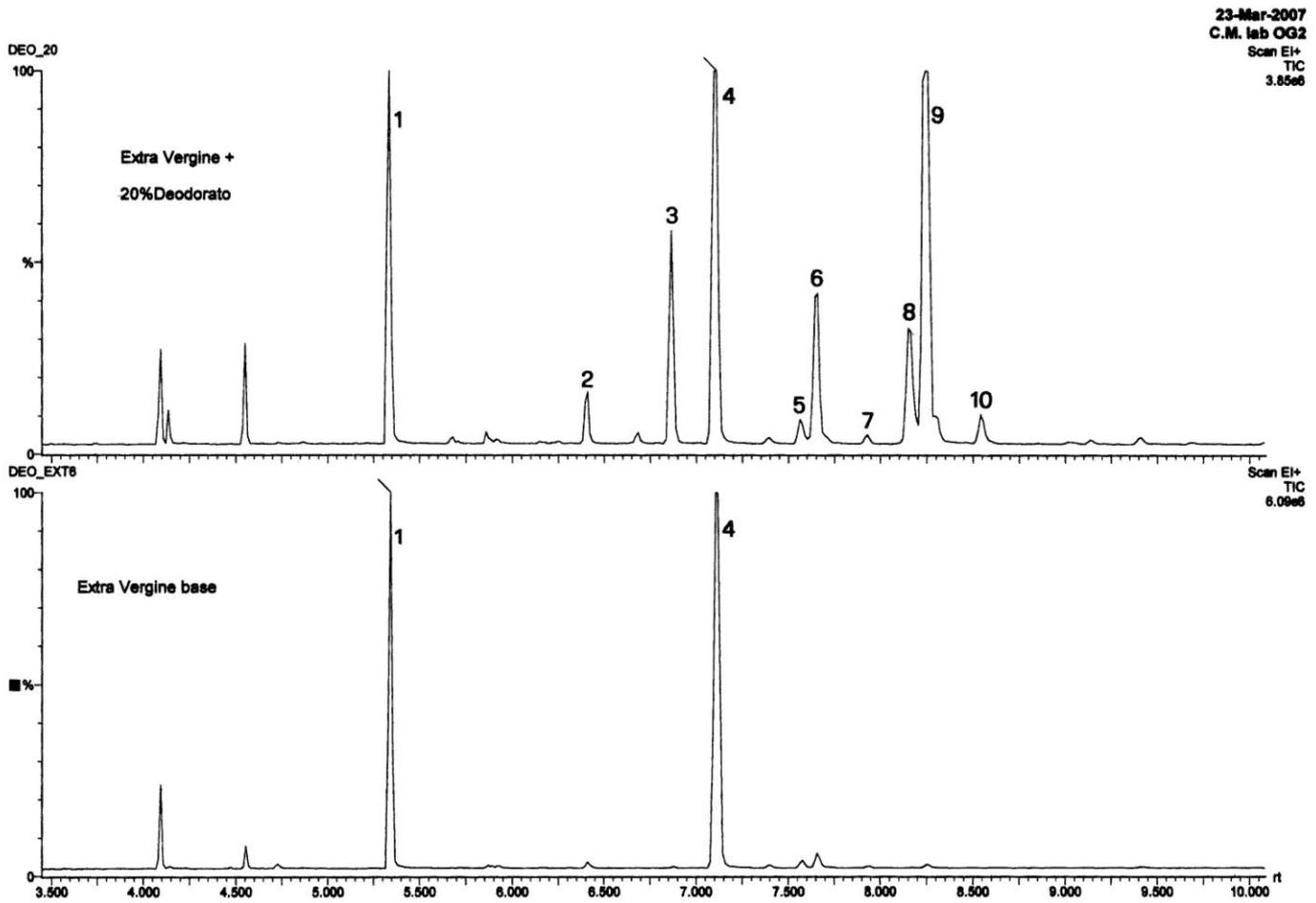


Figure 4 – Partie d'un chromatogramme d'une **huile d'olive vierge extra** et de la **même huile contenant de l'huile désodorisée**.

Légende :

- | | |
|------------------------------------|-------------------------|
| 1 – Myristate méthylique I.S. | 6 – Oléate méthylique |
| 2 – Palmitate méthylique | 7 – Stéarate méthylique |
| 3 – Palmitate éthylique | 8 – Linoléate éthylique |
| 4 – Heptadécanoate méthylique I.S. | 9 – Oléate éthylique |
| 5 – Linoléate méthylique | 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 réglage aux conditions opératoires normales. Chronométrer le temps employé par le gaz pour parcourir la colonne, de l'injection jusqu'à 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 DES CIRES

1. Analyse des résultats de l'essai collaboratif

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

L'essai circulaire proposé par le Secrétariat exécutif en 2008 a été réalisé par 20 laboratoires de 7 pays.

L'essai a porté sur cinq échantillons : huile d'olive et huile d'olive vierge extra

- A : huile d'olive vierge extra commercialisée en Italie
- B : huile d'olive vierge extra commercialisée en Italie
- C : huile d'olive vierge + huile raffinée
- D : huile d'olive vierge extra
- E : lampante huile d'olive vierge extra + commercialisée en Allemagne

L'analyse statistique des résultats de l'essai circulaire a été réalisée par le Secrétariat exécutif du Conseil oléicole international en suivant 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).

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)

	Essai circulaire COI 2008				
	Cires				
	ÉCHANTILLON	ÉCHANTILLON	ÉCHANTILLON	ÉCHANTILLON	ÉCHANTILLON
	1	2	3	4	5
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Médiane	133,0	180,5	201,5	148,2	174,5
Mean	131,8	176,1	196,7	149,6	169,0
n	18	20	20	16	20
outliers	2	0	0	4	0
r	10,30	20,18	19,64	11,71	25,76
Sr	3,47	6,84	6,66	3,91	8,73
RSDr(%)	2,63	3,88	3,38	2,61	5,16
Hor	0,34	0,53	0,47	0,35	0,70
r_R	60,17	75,45	72,36	50,13	60,06
S_R	20,25	25,58	24,53	16,72	20,53
RSD_R(%)	15,37	14,52	12,47	11,17	11,98
HO_R	2,00	1,98	1,72	1,48	1,62

2. Références

- 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

Les valeurs de précision ne sont pas disponibles pour la méthodologie utilisée pour les esters méthyliques et éthyliques.