



## **UTILISATION DES MÉTHODES DU COI POUR LA DÉTERMINATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES**

### **MÉTHODE 1 : COI/T.20/Doc. n° 29/Rev.1 2017. DÉTERMINATION DES BIOPHÉNOLS DANS LES HUILES D'OLIVE PAR HPLC**

#### **OBJET**

Cette méthode décrit une procédure d'extraction et de quantification par HPLC des composés polaires mineurs biophénoliques (BMP) dans les huiles d'olive, tels que les dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligustroside, les lignanes, les flavonoïdes et les acides phénoliques. La gamme de mesure s'étend de 30 mg/kg à 800 mg/kg.

#### **PRINCIPE**

La méthode est basée sur l'extraction directe des composés BMP de l'huile d'olive au moyen d'une solution de méthanol et la quantification ultérieure par HPLC à l'aide d'un détecteur UV à 280 nm. L'acide syringique est utilisé comme étalon interne.

La teneur en dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligustroside, en lignanes, en flavonoïdes et en acides phénoliques est exprimée en mg/kg de tyrosol.

### **MÉTHODE 2 : DÉTERMINATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DANS LES HUILES D'OLIVE PAR SPE-HPLC-DAD**

#### **OBJET**

La norme fournit des orientations pour la détermination des composés phénoliques, libres et liés, dans les huiles d'olive après leur extraction par extraction en phase solide (SPE).

Les composés phénoliques de l'huile d'olive peuvent comprendre des dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligustroside, des lignanes, des flavonoïdes et des acides phénoliques. La fraction est analysée par HPLC-DAD pour obtenir la concentration des composés phénoliques individuels et la quantité totale en mg ou mmol par kg d'huile.

#### **PRINCIPE**

La méthode est basée sur l'extraction directe des composés phénoliques de l'huile d'olive par SPE sur des cartouches en phase diol et la quantification ultérieure directement par HPLC-DAD.

## **DIFFERENCES**

Les deux méthodes isolent la fraction phénolique des huiles d'olive par des moyens différents : extraction liquide-liquide *vs* extraction SPE. Lors de essais collaboratifs réalisés au COI, des différences ont été observées en comparant les résultats obtenus au moyen des différentes méthodes en ce qui concerne la saturation de la phase liquide lorsque la concentration de phénol augmente (la méthode COI/T.20/Doc. n° 29 comprend une gamme de détermination, alors que ce n'est pas le cas de la nouvelle méthode). L'utilisation d'un seul étalon interne peut sous-estimer les flavonoïdes et les ligustrosides. La nouvelle méthode utilise également des facteurs de réponse pour les différents composés phénoliques alors que la méthode n° 29 quantifie en utilisant le tyrosol et peut donc sous-estimer la valeur réelle.

## **UTILISATIONS**

La méthode COI/T.20/Doc. n° 29 peut être utilisée pour effectuer une détermination rapide des phénols à l'aide d'une méthode plus simple, tandis que la nouvelle méthode peut être utilisée pour déterminer la concentration réelle de phénols pour répondre à une allégation de l'EFSA ainsi que la teneur en phénols individuels (par exemple, oléocanthal et oléoscéine).

## MÉTHODE D'ANALYSE n° 1

### DÉTERMINATION DES BIOPHÉNOLS DANS LES HUILES D'OLIVE PAR HPLC

#### 1. OBJET

Cette méthode décrit une procédure d'extraction et de quantification par HPLC des composés polaires mineurs biophénoliques (BMP) dans les huiles d'olive, tels que les dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligstroside, les lignanes, les flavonoïdes et les acides phénoliques. La gamme de mesure s'étend de 30 mg/kg à 800 mg/kg.

**AVERTISSEMENT** : Cette méthode peut nécessiter l'utilisation d'appareils et de produits chimiques dangereux ou l'exécution d'opérations dangereuses. Elle ne précise pas toutes les questions de sécurité liées à son utilisation. Il incombe donc aux utilisateurs de prendre au préalable toutes les mesures de sécurité appropriées et de respecter les exigences légales.

#### 2. PRINCIPE

La méthode est basée sur l'extraction directe des composés BMP de l'huile d'olive au moyen d'une solution de méthanol et la quantification ultérieure par HPLC à l'aide d'un détecteur UV à 280 nm. L'acide syringique est utilisé comme étalon interne.

La teneur en dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligstroside, en lignanes, en flavonoïdes et en acides phénoliques est exprimée en mg/kg de tyrosol.

#### 3. ÉQUIPEMENT

**3.1. Chromatographe liquide à gradient ternaire haute performance (HPLC)**, équipé d'une colonne en phase inverse C18 (4,6 mm x 25 cm), type Spherisorb ODS-2 5µm, 100 A°, avec détecteur spectrophotométrique UV à 280 nm et intégrateur. Température ambiante.

L'enregistrement spectral à des fins d'identification est facilité par l'utilisation d'un détecteur à photodiode dont la gamme spectrale s'étend de 200 nm à 400 nm.

**3.2. Flacons**, 10 mL et 100 mL, classe A.

**3.3. Pipette**, 100 µL, 1000 µL et 5000 µL.

- 3.4. **Tubes à essai**, avec bouchon à vis, 10 mL.
- 3.5. **Agitateur** pour tubes à essai<sup>1</sup>
- 3.6. **Bain d'extraction à ultrasons**.
- 3.7. **Filtres seringues** Ø13 mm, PVDF type 0,45 µm.
- 3.8. **Centrifugeuse** capable de travailler à une vitesse de 5000 min<sup>-1</sup>.
- 3.9. **Balance**, précise à ± 0,001 g.
- 3.10. **Seringues en plastique**, 5 mL.
- 3.11. **Verrerie de laboratoire habituelle**.

#### 4. RÉACTIFS

Les réactifs doivent être de qualité chromatographique HPLC pure.

- 4.1. **Acide orthophosphorique**, 85% (v/v).
- 4.2. **Méthanol**, qualité chromatographique.
- 4.3. **Acétonitrile**, qualité chromatographique.
- 4.4. **Eau**, qualité chromatographique.
- 4.5. **Gradient d'élution linéaire ternaire** : eau 0,2% H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> (v/v) (A), méthanol (B), acétonitrile (C). Les solvants d'élution doivent être dégazés.

L'élution par gradient doit être effectuée comme suit :

##### Élution par gradient

Temp	Débit	A	B	C
min	mL/min	%	%	%
0	1,00	96	2	2
40	1,00	50	25	25
45	1,00	40	30	30
60	1,00	0	50	50
70	1,00	0	50	50
72	1,00	96	2	2
82	1,00	96	2	2

---

<sup>1</sup> Type de vortex.

- 4.6. **2- (4 - hydroxyphényl) éthanol (tyrosol)  $\geq$  98%.**
- 4.7. **Acide 3,5 diméthoxy 4-hydroxy benzoïque (acide syringique)  $\geq$  97%.**
- 4.8. **Solution d'extraction** : méthanol/eau 80/20 (v/v).
- 4.9. **Solution des étalons externes (tyrosol et acide syringique).** Peser avec précision 0,030 g de tyrosol (4.6) et 0,015 g d'acide syringique (4.7) dans une fiole jaugée de 10 mL (3.2). Ajuster au volume avec la solution de méthanol/eau 80/20 (v/v) (4.8).

Transférer 100  $\mu$ L (3.3) de la solution dans une fiole jaugée de 10 mL. Ajuster au volume avec la solution de méthanol/eau 80/20 (v/v) (4.8).

Les concentrations de la solution d'étalonnage externe sont les suivantes : tyrosol 0,030 mg/mL, acide syringique 0,015 mg/mL.

La solution est stable si elle est conservée pendant trois mois au réfrigérateur à +4 °C.

- 4.10. **Préparation de la solution de l'étalon interne (acide syringique).** Peser avec précision 0,015 g (4.7) d'acide syringique dans une fiole jaugée de 10 mL et compléter au trait avec la solution de méthanol/eau 80/20 (v/v) (4.8). Transférer 1 mL (3.3) de la solution dans une fiole jaugée de 100 mL (3.2). Ajuster au volume avec la solution de méthanol/eau 80/20 (v/v) (4.8). La concentration finale est de 0,015 mg/mL.

La solution est stable si elle est conservée pendant trois mois au réfrigérateur à +4 °C.

## 5. PROCÉDURE

### 5.1. Préparation de l'échantillon

Dans un tube à essai de 10 mL à bouchon à vis (3.4), peser avec précision 2,0 g d'huile d'olive.

Transférer 1 mL de la solution étalon interne (4.10) sur l'échantillon préalablement pesé.

Fermer avec le bouchon à vis et agiter (3.5) pendant exactement 30 s.

Ajouter 5 mL (3.3) de la solution d'extraction méthanol/eau 80/20 (v/v) (4.8).

Agiter (3.5) pendant exactement 1 min.

Extraire dans le bain à ultrasons (3.6) pendant 15 min à température ambiante.

Centrifuger à 5000 tours/min pendant 25 min (3.8).

Prélever une aliquote de la phase surnageante et la filtrer à travers une seringue en plastique de 5 mL (3.10), avec un filtre PVDF de 0,45  $\mu$ m (3.7).

### 5.2. Analyse HPLC

Allumer le spectrophotomètre UV au moins une heure avant l'analyse.

La colonne de chromatographie doit être conditionnée pendant au moins 15 min avec le solvant d'éluion (composition initiale) (eau 0,2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (v/v) /méthanol/acétonitrile 96/2/2 (v/v/v)) (éluion à gradient).

Effectuer à chaque fois un passage préliminaire en chromatographie à gradient vide (pour s'assurer qu'il n'y a pas de pics de coélution interférents) en injectant 20 µL de méthanol/eau 80/20 (v/v) (4.8) dans le système HPLC.

Injecter 20 µL de la solution étalon externe (4.9) et enregistrer le chromatogramme à 280 nm. Calculer les valeurs des facteurs de réponse pour 1 µg de tyrosol et 1 µg d'acide syringique (6.1).

Calculer le rapport du facteur de réponse de l'acide syringique au tyrosol, appelé  $RRF_{syr/tyr}$ . Noter les valeurs (6.2).

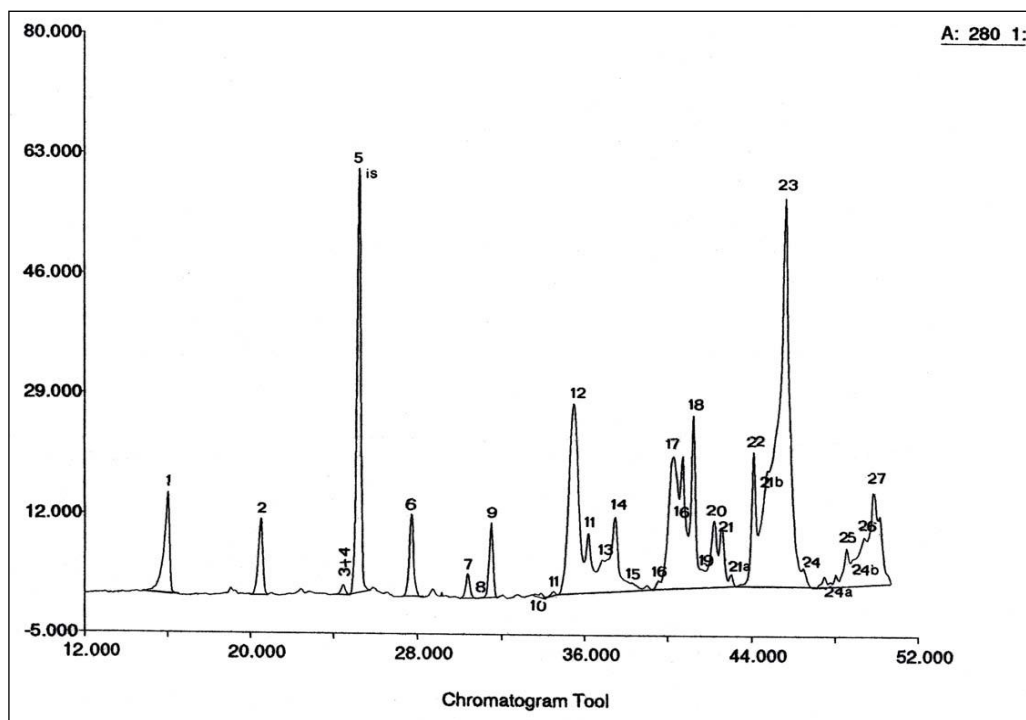
Injecter 20 µL de la solution d'échantillon final dans le système HPLC et enregistrer le chromatogramme à 280 nm.

Effectuer deux déterminations indépendantes sur le même échantillon et vérifier que les résultats se situent à l'intérieur des valeurs de précision de la méthode.

La **Figure 1** montre un chromatogramme typique des biophénols dans une huile d'olive vierge extra caractérisée par un composant individuel.

La somme des aires des différents pics doit être prise en compte pour calculer la teneur totale.

À la fin de la journée, rincer la colonne chromatographique avec du méthanol/acétonitrile 1/1 (v/v) à un débit de 1,0 mL/min pendant au moins 15 min et conserver la colonne dans du méthanol/acétonitrile 1/1 (v/v).



**Figure 1.** Chromatogramme HPLC enregistré à 280 nm pour le profil des biophénols présents dans une huile d'olive vierge extra

### 6.1. Calcul des facteurs de réponse des étalons externes (RF)

$RF_{1 \mu g}$  (acide syringique) = Aire acide syringique/ $\mu g$  acide syringique injecté

$RF_{1 \mu g}$  (tyrosol) = Aire tyrosol/ $\mu g$  tyrosol injecté

### 6.2. Calcul du ratio entre les deux facteurs de réponse (RRF)

$RRF_{syr/tyr} = RF_{1 \mu g}$  (acide syringique)/  $RF_{1 \mu g}$ (tyrosol)

La valeur du  $RRF_{syr/tyr}$  doit être constante et se situer dans l'intervalle  $5,1 \pm 0,4$ . Elle permet d'exprimer le résultat final en tyrosol, en utilisant l'acide syringique comme étalon interne.

### 6.3. Calcul de la teneur en biophénols de l'huile d'olive vierge

La teneur en biophénols (hydroxytyrosol, tyrosol, dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligstroside, lignanes, flavonoïdes et acides phénoliques), exprimée en mg/kg, est calculée en mesurant la somme des aires des pics chromatographiques correspondants (identification dans le **Tableau 1**) selon la formule suivante. Le résultat est exprimé sans décimale.

$$(\text{mg/kg}) = \frac{(\Sigma A) \times 1000 \times RRF_{syr/tyr} \times (W \text{ acide syr.})}{(A \text{ acide syr.}) \times (W)}$$

où :

( $\Sigma A$ ) est la somme des aires des pics des biophénols (hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropéine naturelle et oxydée et dérivés du ligstroside, lignanes, flavonoïdes et acides phénoliques) enregistrés à 280 nm ;

A acide syr. est l'aire de l'étalon interne d'acide syringique enregistrée à 280 nm ;

1000 est le facteur utilisé pour exprimer le résultat en mg/kg ;

W est le poids de l'huile utilisée en g ;

$RRF_{syr/tyr}$  est le coefficient multiplicateur pour exprimer les résultats finaux en tyrosol ;

W acide syr. est le poids, en mg, de l'acide syringique utilisé comme étalon interne dans 1 mL de solution ajoutée à l'échantillon.

**Tableau 1**  
**Identification des pics de biophénols**  
**Valeurs d'absorbance maximale (abs UV max) et temps de rétention relatifs (RRT)\***

Pic n°	Biophénols	RRT*	Abs. UV max. nm
1	Hydroxytyrosol	0.62	230-280
2	Tyrosol	0.80	230-275
3	Acide vanillique	0.96	260
4	Acide caféique	0.99	325
5	Acide syringique (étalon interne)	1.00	280
6	Vanilline	1.10	310
7	Acide para-coumarique	1.12	310
8	Acétate d'hydroxytyrosyle	1.20	232-285
9	Acide férulique	1.26	325
10	Acide ortho-coumarique	1.31	325
11;11a	Décarboxyméthyl oleuropéine aglycone, forme dialdéhyde oxydée	-	235-280
12	Décarboxyméthyl oleuropéine aglycone, forme dialdéhyde	1.45	235-280
13	Oleuropéine	1.48	230-280
14	Aglycone de l'oleuropéine, forme dialdéhyde	1.52	235-280
15	Acétate de tyrosyle	1.54	230-280
16;16a	Décarboxyméthyl ligstroside aglycone, forme dialdéhyde oxydée	1.63	235-275
17	Décarboxyméthyl ligstroside aglycone, forme dialdéhyde	1.65	235-275
18	Pinorésinol, 1 acétoxy-pinorésinol	1.69	232-280
19	Acide cinnamique	1.73	270
20	Aglycone du ligstroside, forme dialdéhyde	1.74	235-275
21;21a ;21b	Aglycone de l'oleuropéine, aldéhyde oxydé et forme hydroxylique	-	235-280
22	Lutéoline	1.79	255-350
23	Aglycone de l'oleuropéine, forme aldéhydique et hydroxylique	1.87	235-280
24;24a ;24b	Aglycone du ligstroside, aldéhyde oxydé et forme hydroxylique	-	235-275
25	Apigénine	1.98	230-270-340
26	Méthyl-lutéoline	-	255-350
27	Aglycone ligstroside, forme aldéhydique et hydroxylique	2.03	235-275



(\*) Le temps de rétention relatif est calculé par rapport au temps de rétention de l'acide syringique. L'identification est effectuée par HPLC-MS.

## **7. RAPPORT D'ESSAI**

Le rapport d'essai doit préciser les informations suivantes :

- (a) La référence de cette méthode.
- (b) Les résultats des essais, exprimés en mg/kg d'huile (sans décimales).
- (c) La valeur RRF utilisée pour les calculs.
- (d) Toute dérogation à cette méthode, faite par accord entre les parties concernées ou pour toute autre raison.
- (e) Les données d'identification du laboratoire, la date à laquelle l'essai a été effectué et la signature du superviseur de l'essai.

## VALEURS DE PRÉCISION

### 1. Analyse des résultats des essais collaboratifs

Les valeurs de précision de la méthode sont données dans le tableau ci-joint.

Les 17 laboratoires agréés par le COI au moment de la rédaction du présent rapport ont participé à l'essai collaboratif organisé par le Secrétariat exécutif du COI en 2008. Ces laboratoires provenaient de huit pays différents.

**Échantillon A** - Huile d'olive vierge extra (Italie)

**Échantillon B** - Huile d'olive vierge extra (Espagne)

**Échantillon C** - Huile d'olive vierge extra (Tunisie)

**Échantillon D** - Huile d'olive vierge extra (Slovénie)

**Échantillon E** - Huile d'olive vierge extra (Grèce)

**Échantillon R** - Huile d'olive vierge extra (Italie)

Les résultats de l'essai collaboratif ont été traités statistiquement selon les règles définies dans les normes internationales ISO 5725.

### Exactitude (justesse et précision) des méthodes et des résultats de mesure

Les valeurs aberrantes ont été examinées en appliquant les tests de Cochran et Grubbs aux résultats du laboratoire pour toutes les déterminations (répliques a et b).

Le tableau énumère :

n	Nombre de laboratoires participants.
Outliers	Nombre de laboratoires avec des valeurs aberrantes.
Mean	Moyenne des résultats acceptés.
r	Valeur au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95%, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai indépendants obtenus avec la même méthode sur un matériau d'essai identique dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même équipement dans de courts intervalles de temps.
Sr	Écart-type de répétabilité.
RSDr	(%) coefficient de variation de la répétabilité ( $Sr \times 100 / \text{médiane}$ ).
R	Valeur au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95%, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essais individuels obtenus avec la même méthode sur un matériau d'essai identique dans des laboratoires différents, avec des opérateurs différents utilisant des équipements différents.
S <sub>R</sub>	Écart-type de reproductibilité.
RSD <sub>R</sub> (%)	Coefficient de variation de la reproductibilité ( $SR \times 100 / \text{médiane}$ ).

**Valeurs de précision pour la teneur totale en biophénol (mg/kg)**

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>R</b>
<b>n</b>	17	17	17	17	17	17
<b>Outliers</b>	3	3	1	2	2	2
<b>Mean</b>	694	573	153	343	297	301
<b>r</b>	29	36	18	24	22	17
<b>S<sub>r</sub></b>	10,4	12,7	6,4	8,7	7,7	6,2
<b>RSD<sub>r</sub>(%)</b>	1,5	2,2	4,2	2,5	2,6	2,1
<b>R</b>	100,8	83,7	59,6	62,7	77,0	32,2
<b>S<sub>R</sub></b>	36,0	29,9	21,3	22,4	27,5	11,5
<b>RSD<sub>R</sub>(%)</b>	5,2	5,2	14,0	6,5	9,3	3,8

**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 précision) 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

## **MÉTHODE D'ANALYSE n° 2**

### **DÉTERMINATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DANS LES HUILES D'OLIVE**

#### **1. OBJET**

La norme fournit des orientations pour la détermination des composés phénoliques, libres et liés, dans les huiles d'olive après leur extraction par extraction en phase solide (SPE).

Les composés phénoliques de l'huile d'olive peuvent comprendre des dérivés naturels et oxydés de l'oleuropéine et du ligustroside, des lignanes, des flavonoïdes et des acides phénoliques.

La fraction est analysée par HPLC-DAD pour obtenir la concentration des composés phénoliques individuels et la quantité totale en mg ou mmol par kg d'huile.

#### **2. PRINCIPE**

La méthode est basée sur l'extraction directe des composés phénoliques de l'huile d'olive par SPE sur des cartouches en phase diol et la quantification ultérieure par HPLC-DAD.

## **ANALYSE DE LA FRACTION PHÉNOLIQUE DES HUILES D'OLIVE**

### **1. PORTÉE ET DOMAINE D'APPLICATION**

Cette méthode clarifie l'isolement des composés phénoliques, libres et liés, des huiles d'olive en utilisant des cartouches SPE avec une phase liée aux diols.

### **2. MÉTHODOLOGIE**

#### **2.1. ISOLEMENT DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES PAR SPE-DIOL**

##### **2.1.1. APPLICABILITÉ**

Cette méthode est applicable au processus d'extraction des composés phénoliques, libres et liés, au moyen de cartouches SPE avec une phase liée aux diols avant l'analyse par HPLC-DAD.

##### **2.1.2. RÉACTIFS ET APPAREILS**

- 2.1.2.1. Méthanol, qualité chromatographique.
- 2.1.2.2. n-Hexane, qualité chromatographique.
- 2.1.2.3. Cartouche SPE, phase liée au diol, 3 mL (500 mg).
- 2.1.2.4. Acétate d'éthyle, qualité chromatographique.
- 2.1.2.5. Mélange d'élution, hexane:acétate d'éthyle (v/v 85:15).
- 2.1.2.6. Eau désionisée ou distillée.
- 2.1.2.7. Mélange, méthanol:eau (v/v 1:1).
- 2.1.2.8. Fiole conique, 10 et 25 mL.
- 2.1.2.9. Mélangeur vortex.
- 2.1.2.10. Balance, précise à  $\pm 0,001$  g.
- 2.1.2.11. Solution étalon interne, *p*-hydroxyphénylacétique, 0,12 mg/mL et acide *o*-coumarique, 0,01mg/mL dans du méthanol.
- 2.1.2.12. Évaporateur rotatif.
- 2.1.2.13. Équipement d'extraction en phase solide (sous vide).

##### **2.1.3. PROCÉDURE**

###### **2.1.3.1. Préparation de l'échantillon**

Dans une fiole conique de 10 mL (2.1.2.8), peser environ 2,5 g d'huile, avec une précision de 0,001 g. Ajouter 500  $\mu$ L de la solution d'étalon interne (2.1.2.11). Agiter doucement et

évaporer pendant environ 6-7 min dans un courant d'azote très doux ou dans un évaporateur rotatif à température ambiante.

### **2.1.3.2. Isolement de la fraction**

Placer la cartouche SPE (2.1.2.3) dans l'équipement SPE (2.1.2.13). Activer la cartouche (2.1.2.3) en faisant passer 6 mL de méthanol (2.1.2.1) et 6 mL de n-hexane (2.1.2.2) sans vide. Veiller à ce que la cartouche ne sèche pas pendant l'élution.

L'échantillon d'huile du point 2.1.3.1 est dilué avec 6 mL de n-hexane (2.1.2.2) et placé dans la cartouche SPE activée. Laisser l'échantillon pénétrer dans la cartouche. Laver le flacon (2.1.2.8) avec 6 mL de n-hexane et le placer dans la colonne. Laisser l'échantillon s'écouler de la cartouche et le jeter.

Éluer avec 4 mL du mélange d'élution (2.1.2.5) et jeter. Éluer maintenant avec 10 mL de méthanol (2.1.2.1) et recueillir l'élution dans une fiole conique de 25 mL (2.1.2.8). Évaporer dans un évaporateur rotatif à température ambiante sous vide jusqu'à ce que le produit soit sec.

Dissoudre le résidu dans 500 µL du mélange méthanol/eau (2.1.2.7). Agiter ensuite vigoureusement à l'aide d'un vortex (2.1.2.9). Conserver cette solution finale à l'obscurité et au frais pendant au moins quatre heures avant le dosage.

## **2.2. DÉTERMINATION PAR HPLC-DAD DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES ISOLÉS**

### **2.2.1. PORTÉE ET CHAMP D'APPLICATION**

La méthode de référence quantifie l'extrait phénolique par HPLC à plusieurs longueurs d'onde UV, les phénols (sauf l'acide férulique), l'acide cinnamique et les lignanes sont déterminés à 280 nm en utilisant l'acide *p*-hydroxyphénylacétique comme étalon interne et les flavones et l'acide férulique sont déterminés à 335 nm en utilisant l'acide *o*-coumarique comme étalon interne.

### **2.2.2. RÉACTIFS ET APPAREILS**

- 2.2.2.1. Filtre à seringue en acétate de cellulose (0,45 µm).
- 2.2.2.2. Tube Eppendorf.
- 2.2.2.3. Méthanol, qualité chromatographique.
- 2.2.2.4. Acétonitrile, qualité chromatographique.
- 2.2.2.5. Eau désionisée ou distillée.
- 2.2.2.6. Acide phosphorique, qualité analyse.
- 2.2.2.7. Solvant d'élution A, eau:acide phosphorique (v/v 99,5:0,5).
- 2.2.2.8. Solvant d'élution B, méthanol:acétonitrile (v/v 1:1).

**2.2.2.9.** HPLC équipé d'un détecteur DAD et d'un four.

**2.2.2.10.** Colonne HPLC RP-18 (4,0 mm de diamètre interne x 250 mm ; taille des particules 5 µm).

### **2.2.3. PROCÉDURE**

Filtrer la solution obtenue dans la partie 1 avec un filtre à seringue (2.1) et placer la solution filtrée dans un tube Eppendorf (2.2).

Injecter 20 µL de la solution filtrée dans le HPLC (2.9) équipé d'une colonne en phase inverse (2.10) maintenue à 30 °C. Effectuer l'élution par un gradient (Tableau 1) en utilisant le solvant A (2.7) et le solvant B (2.8) à un débit de 1 mL/min. Les longueurs d'onde de détection sont de 280 et 335 nm.

<b>Tableau 1. Calendrier d'élution des gradients</b>		
<b>Temps (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0,0	95,0	5,0
15,0	70,0	30,0
30,0	62,0	38,0
35,0	62,0	38,0
40,0	55,0	45,0
45,0	47,5	52,5
50,0	0,0	100,0

## 2.2.4. EXPRESION DES RÉSULTATS

### 2.2.4.1. Analyse quantitative

Calculer la fraction massique  $w_i$  des composés phénoliques individuels en utilisant les facteurs de réponse de chaque composé phénolique individuel au détecteur (voir annexe 1), exprimés en mg ou mMol par kg d'échantillon d'huile, comme suit :

$$W_i = \frac{m_{IS} \times F_i \times A_i}{m \times F_{IS} \times A_{IS}}$$

Où :

$A_i$  est l'aire du composé phénolique  $i$ .

$A_{IS}$  est l'aire de l'étalon interne.

$F_i$  est le facteur de réponse du composé phénolique  $i$ .

$F_{IS}$  est le facteur de réponse de l'étalon interne.

$m$  est la masse de la portion d'essai, en grammes.

$m_{IS}$  est la masse de l'étalon interne, en milligrammes.

Les résultats sont exprimés à une décimale près en mg/kg.

$$W_i = \frac{m_{IS} \times F_i \times A_i}{m \times F_{IS} \times A_{IS} \times M_i}$$

Où :

$A_i$  est l'aire du composé phénolique  $i$ .

$A_{IS}$  est l'aire de l'étalon interne.

$F_i$  est le facteur de réponse du composé phénolique  $i$ .

$F_{IS}$  est le facteur de réponse de l'étalon interne.

$m$  est la masse de la portion d'essai, en grammes.

$m_{IS}$  est la masse de l'étalon interne, en milligrammes.

$M_i$  est la masse moléculaire du composé phénolique.

Les résultats sont exprimés à trois décimales près en mmol/kg.



### 3. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai précise la méthode utilisée pour isoler la fraction phénolique et les conditions de l'analyse HPLC. Il mentionne également tous les détails de l'opération non spécifiés dans le présent règlement, ou considérés comme facultatifs, ainsi que les détails de tout incident ayant pu influencer les résultats. Le rapport d'essai doit comporter toutes les informations nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

### 4. PRÉCISION

#### Résultats de l'essai interlaboratoire

Les valeurs de précision de la méthode sont données dans le tableau ci-joint.

L'essai consiste à analyser cinq échantillons d'huile d'olive vierge extra avec un échantillon en double.

- M1 : HOVE
- M2 : HOVE
- M3 : HOVE
- M4 : M2
- M5 : HOVE

Une vingtaine de laboratoires ont participé à l'essai, chacun d'entre eux ayant le code correspondant.

Les résultats de l'essai collaboratif organisé par le Secrétariat exécutif du COI ont été traités statistiquement selon les règles établies dans les normes internationales. Les données ont d'abord été examinées conformément à la recommandation de l'INTERLABORATORY COLLABORATIVE STUDY. AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2002). Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis.

Exactitude (justesse et fidélité) des méthodes de mesure et des résultats.

Les valeurs aberrantes ont été examinées en appliquant la révision initiale et les tests de Cochran et Grubbs aux résultats du laboratoire pour toutes les déterminations (répétitions a et b).

Laboratoires éliminés lors de la révision initiale : 9.

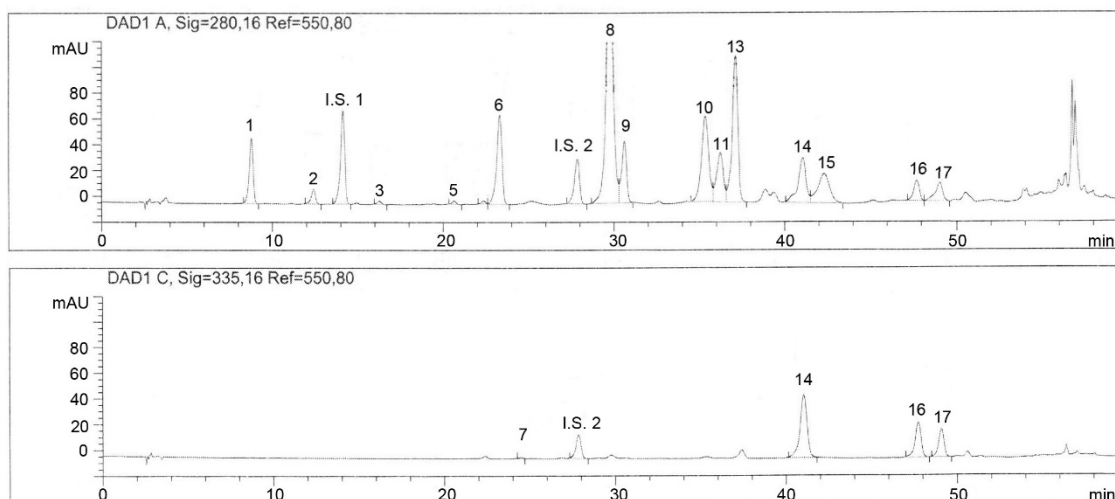
**Le tableau mentionne :**

n	Nombre de laboratoires participants.
Outliers	Nombre de laboratoires avec des valeurs aberrantes.
Mean	Moyenne des résultats acceptés.
Median	
r	Valeur au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95%, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai indépendants obtenus avec la même méthode sur un matériau d'essai identique dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même équipement dans de courts intervalles de temps.
S <sub>r</sub>	Écart-type de répétabilité.
RSD <sub>r</sub>	(%) coefficient de variation de la répétabilité (S <sub>r</sub> x 100 / médiane).
R	Valeur au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95%, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essais individuels obtenus avec la même méthode sur un matériau d'essai identique dans des laboratoires différents, avec des opérateurs différents utilisant des équipements différents.
S <sub>R</sub>	Écart-type de reproductibilité.
RSD <sub>R</sub> (%)	Coefficient de variation de la reproductibilité (S <sub>R</sub> x 100/médiane).

**Valeurs de précision pour la teneur en phénol total (mg/kg)**

Variable	Échantillons				
	1	2	3	4	5
n	11	11	11	11	11
Outliers	1	1	2	2	2
Mean (mg/kg)	232,45	474,90	461,55	517,40	598,62
Median (mg/kg)	223,30	504,39	451,79	495,37	572,00
r	35,43	63,75	21,42	47,71	41,19
S <sub>r</sub>	12,527	24,602	7,573	16,870	15,019
<b>RSD<sub>r</sub>(%)</b>	5,61	4,51	1,68	3,41	2,46
R	96,27	210,65	147,80	175,38	145,48
S <sub>R</sub>	34,037	85,774	52,255	62,006	69,285
<b>RSD<sub>R</sub>(%)</b>	15,24	15,58	11,57	12,52	9,02

## ANNEXE 1

**Figure 1. Chromatogramme HPLC-DAD des composés phénoliques isolés par SPE-diol****Tableau 1. Temps de rétention relatif et facteur de réponse des composés phénoliques isolés par SPE-diol et analysés par HPLC-DAD.**

Pic HPLC	Composé	RRT (min)	Facteur de réponse
1	Hydroxytyrosol	0.62 <sup>e</sup>	0.646 <sup>g</sup>
2	Tyrosol	0.88 <sup>e</sup>	0.829 <sup>g</sup>
I.S. 1	Acide <i>p</i> -hydroxyphénylacétique	1.00	1.000
3	Acide vanillique	1.15 <sup>e</sup>	0.206 <sup>g</sup>
4	Vanilline	1.37 <sup>e</sup>	0.126 <sup>g</sup>
5	Acide <i>p</i> -coumarique	1.46 <sup>e</sup>	0.106 <sup>g</sup>
6	Acétate d'hydroxytyrosyle	1.65 <sup>e</sup>	0.788 <sup>g</sup>
7	Acide férulique	0.88 <sup>f</sup>	0.542 <sup>h</sup>
I.S. 2	Acide <i>o</i> -coumarique	1.00	1.000
8	DDOA <sup>a</sup>	2.11 <sup>e</sup>	1.303 <sup>g</sup>
9	Isomère de l'AOA <sup>c</sup>	2.17 <sup>e</sup>	1.093 <sup>g</sup>
10	DDLA <sup>b</sup>	2.50 <sup>e</sup>	1.843 <sup>g</sup>
11	Pinorésinol	2.56 <sup>e</sup>	0.197 <sup>g</sup>
12	Acide cinnamique	----	0.057 <sup>g</sup>
13	1-Acétoxypinorésinol	2.63 <sup>e</sup>	0.584 <sup>g</sup>
14	Lutéoline	1.47 <sup>f</sup>	0.836 <sup>h</sup>
15	AOA <sup>c</sup>	2.99 <sup>e</sup>	1.587 <sup>g</sup>
16	Apigénine	1.71 <sup>f</sup>	0.833 <sup>h</sup>
17	AOL <sup>d</sup>	3.47 <sup>e</sup>	2.121 <sup>g</sup>

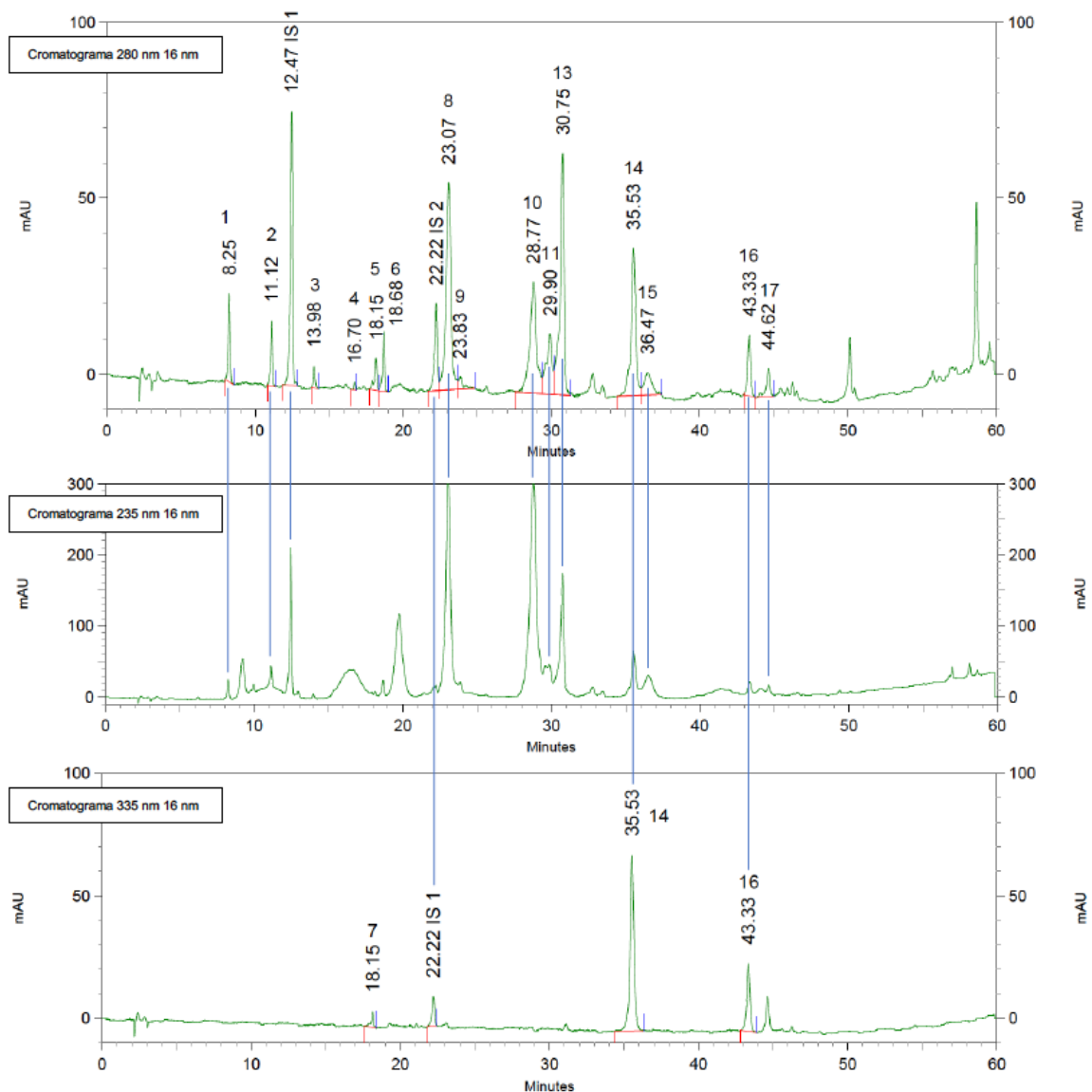
a) forme dialdéhydrique décarboxyméthyl oleuropéine aglycone ; b) forme dialdéhydrique décarboxyméthyl ligstroside aglycone ; c) forme dialdéhydrique aglycone de l'oleuropéine ; d) forme dialdéhydrique aglycone du ligstroside ; e) temps de

rétention relatif par rapport à I.S. 1. ; f) temps de rétention relatif par rapport à I.S. 2. ; g) facteur de réponse relatif par rapport à I.S. 1. ; h) facteur de réponse relatif par rapport à I.S. 2.

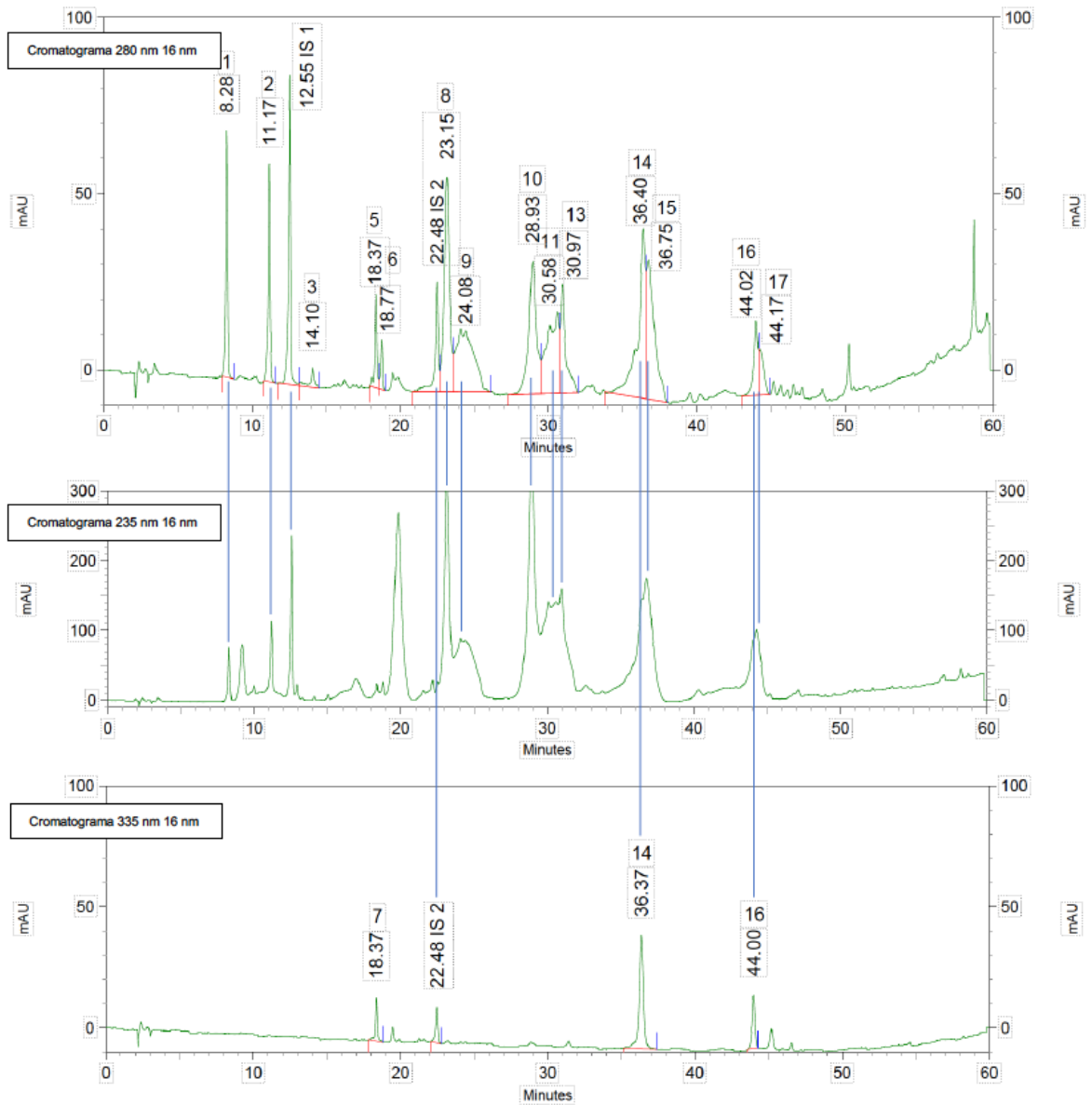
## ANNEXE 2 : EXEMPLES DE DIFFÉRENTS PROFILS DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les exemples de chromatogrammes peuvent aider à identifier les différents phénols à l'aide des différentes longueurs d'onde. Les lignes représentent la connexion entre les différents phénols dans les différents chromatogrammes.

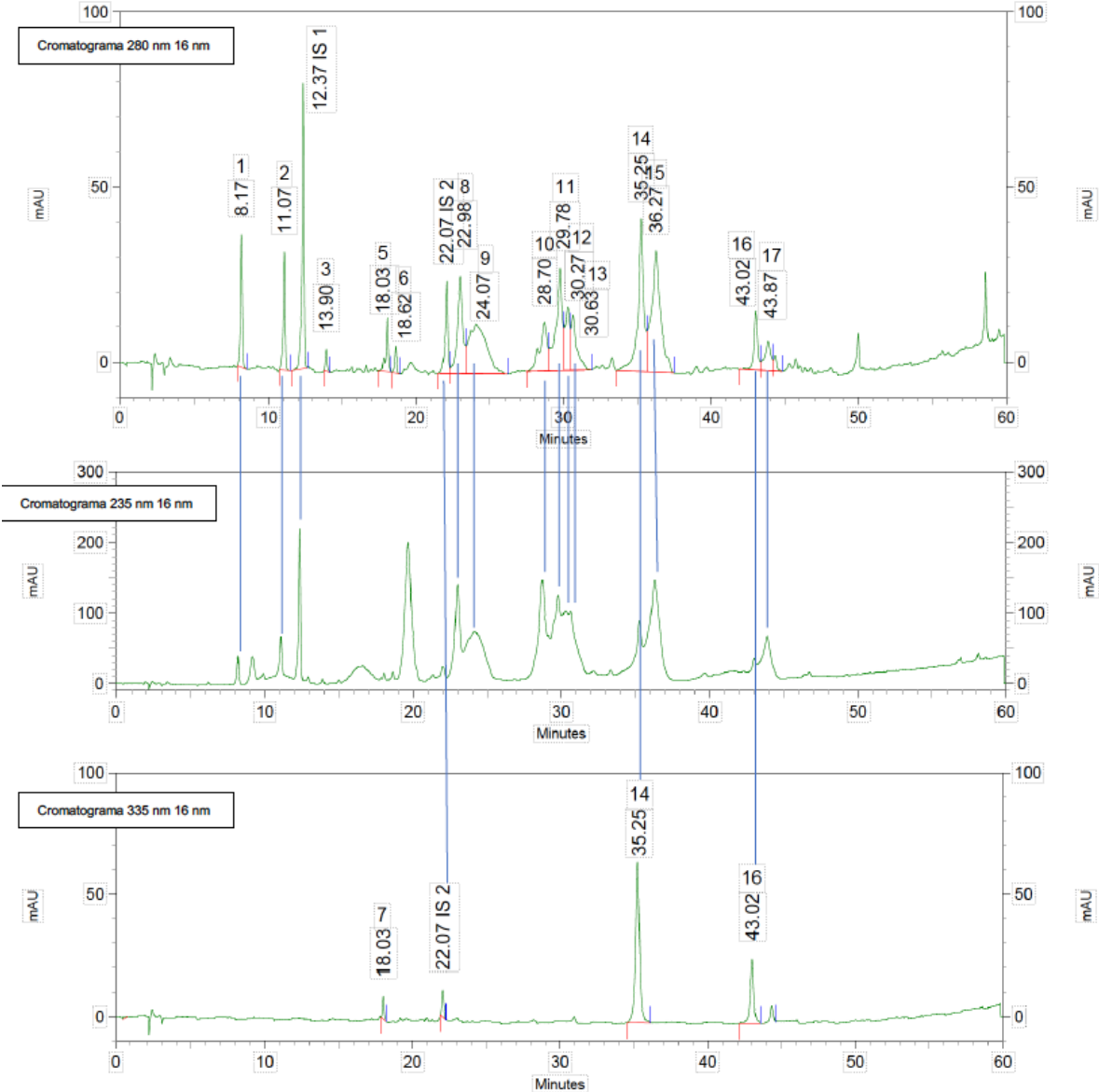
### HUILE 1



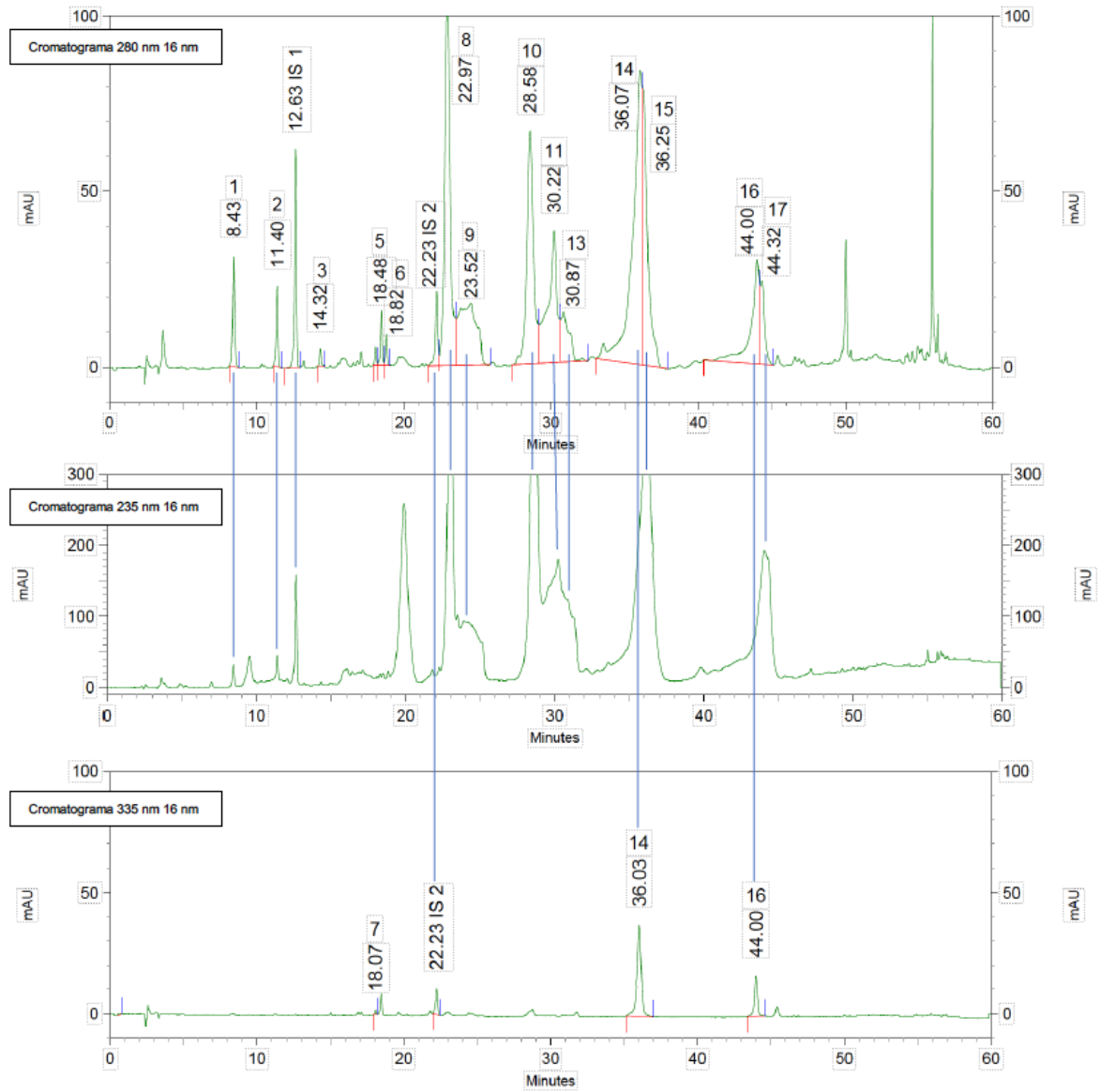
## HUILE 2



HUILE 3



## HUILE 4



## HUILE 5

