

DECISION
du Comité de Ministres de l'Union économique Benelux
concernant l'application de méthodes d'analyse de référence Benelux
relatives aux huiles comestibles
M (80) 5

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu l'article 1^{er} du Protocole du 29 avril 1969, relatif à la suppression des contrôles et formalités aux frontières intérieures du Benelux et à la suppression des entraves à la libre circulation,

Vu la Décision du Comité de Ministres du 31 août 1973, relative à l'harmonisation des législations relatives aux huiles comestibles, M (73) 29,

Considérant qu'il y a lieu d'éviter des contestations nées de l'application de techniques d'analyse différentes ou de l'emploi de normes différentes,

Considérant qu'en particulier l'harmonisation du contrôle des denrées alimentaires exige la mise en œuvre de techniques identiques ou équivalentes et l'emploi de modes d'expression semblables et le recours à des normes identiques ou équivalentes,

A pris la décision suivante :

Article unique

1. Les Gouvernements des trois pays du Benelux prendront les mesures nécessaires pour que les dispositions reprises dans le Règlement annexé à la présente Décision soient considérées à partir du 1^{er} octobre 1980 comme seule méthode de référence.
2. Dans les 6 mois qui suivent l'expiration du délai prévu au § 1, chacun des trois Gouvernements fait rapport au Comité de Ministres sur les mesures qui ont été prises pour l'exécution de cette Décision. Le texte des mesures d'exécution nationales sera joint à ce rapport.

FAIT à Bruxelles, le 17 octobre 1980.

Le Président du Comité de Ministres,

G. THORN

METHODES D'ANALYSE DE REPERENCE RELATIVES AUX HUILES COMESTIBLES

I. Antioxydants

1. Analyse qualitative

1.1. Appareillage

Accessoires usuels de laboratoire ainsi qu* :

1. Cuve de développement pour chromatographie sur couche mince, convenant pour des plaques à couche mince de 200 x 200 mm.
2. Plaques à couche mince de 200 x 200 mm, couvertes de gel de silice Mcherey et Nagel G-HR (*) ou équivalent, épaisseur de la couche 0,40 mm. Dans un vase conique à bouchon rôdé de 300 ml, peser 30 gr de gel de silice M et N G-HR et ajouter 60 ml d'eau distillée, boucher le vase et homogénéiser son contenu pendant une minute sur un agitateur mécanique. A l'aide d'un appareil approprié, étendre la suspension sur l'une des plaques de 200 x 200 mm de manière à obtenir une couche de 0,40 mm d'épaisseur. Laisser sécher les plaques à l'air pendant une nuit et les conserver dans un exciccateur au-dessus de gel de silice.
Activer extemporanément les plaques en les plaçant pendant une heure dans une étuve à 60° C.
3. Evaporateur rotatif.
4. Etuve électrique, bien ventilable et réglable à 103 ± 2° C.
5. Etuve électrique, bien ventilable et réglable à 60 ± 2° C.

1.2. Réactifs

1. Ethanol p.a. absolu.
2. Ether de pétrole, point d'ébullition 40-60° C.
3. Acétonitrile p.a.
4. Benzène p.a.
5. Acide acétique p.a.
6. Méthanol p.a. absolu.
7. Gallate de propyle n (PG)
8. Gallate d'octyle n (OG)
9. Gallate de dodécyle n (DG)

(*) La mention de marques commerciales ne constitue pas une recommandation mais sert uniquement d'identification.

10. Palmitate d'ascorbyle (AP)
11. 3-t-Butyl-4-hydroxyanisol (BHA)
12. 3,5-di-t-Butyl-4-hydroxyanisol (DBHA)
13. 3,5-di-t-Butyl-4-hydroxytoluène (BHT)
14. t-Butylhydroquinone (TBH)
15. Acétonitrile saturé d'éther de pétrole.
Dans un flacon de 1000 ml, déposer 900 ml d'acétonitrile p.a., ajouter 100 ml d'éther de pétrole 40-60° C et un peu de CaCl₂, mélanger, boucher le flacon et laisser reposer pendant une nuit.
16. Ether de pétrole (40-60) saturé d'acétonitrile. Dans un flacon de 1000 ml, déposer 900 ml d'éther de pétrole (40-60), ajouter 100 ml d'acétonitrile p.a. et un peu de CaCl₂, mélanger, boucher le flacon et laisser reposer pendant une nuit.
17. Réactifs à vaporiser. Solution à 0,5 % (m/v) de 2.6-dichlorequinon-chlorimide dans de l'éthanol absolu p.a. Dissoudre 500 mg de 2.6.-dichlorequinonchlorimide dans 100 ml d'éthanol absolu p.a.
18. Liquide de développement : mélanger extemporanément 2 volumes d'éther de pétrole (40-60), 2 volumes de benzène p.a. et 1 volume d'acide acétique p.a.

1.3. Solutions de référence

1. Dissoudre, dans du méthanol (1.2.6.), 100 mg de chacun des anti-oxydants cités de 1.2.7. à 1.2.13., compléter jusqu'au trait à l'aide de méthanol dans un ballon jaugé de 100 ml et mélanger ; solution à 0,1 % (m/v).
2. Préparer selon 1.3.1. une solution à 0,2 % (m/v) de t-butylhydroquinone.

1.4. Isolement

1. Dissoudre 7,5 à 10 gr d'huile ou de graisse dans 100 ml d'éther de pétrole 40-60 et transférer la solution dans une ampoule à décantation de 500 ml.
2. Rincer la verrerie utilisée à l'aide de 25 ml d'acétonitrile saturé d'éther de pétrole (1.2.15.) et ajouter le liquide de rinçage au contenu de l'ampoule à décantation (1.4.1.). Agiter pendant une minute et recueillir la phase d'acétonitrile (couche inférieure) dans une ampoule à décantation de 250 ml.

REMARQUE :

Les émulsions qui se forment éventuellement peuvent aisément être dissociées en chauffant, tout en agitant prudemment, la phase d'acétonitrile dans de l'eau courante à environ 50° C.

3. Répéter encore 3 fois l'extraction décrite sous 1.4.2.
4. Agiter à deux reprises les extraits recueillis d'acétonitrile, chaque fois avec 15 ml d'éther de pétrole 40-60 saturé d'acétonitrile (1.2.16.).
5. Déposer l'extrait d'acétonitrile dans un ballon à fond rond de 150 ml et évaporer le solvant, sous vide, dans un évaporateur rotatif à la plus basse température possible. La température du bain-marie ne doit pas dépasser 40° C.
6. Reprendre le résidu par 2 ml de méthanol absolu et déposer la solution dans un petit flacon de réserve. La solution doit être filtrée si le résidu n'est pas entièrement passé en solution.

REMARQUE :

Si les teneurs en antioxydants escomptées sont inférieures à 0,01 %, il est recommandable de reprendre le résidu par 1 ml de méthanol.

1.5. Chromatographie et détection

1. Dans la cuve de développement, déposer une quantité de liquide de développement (1.2.18.) telle que la surface du liquide se trouve à environ 1 cm au-dessus du fond de la cuve. Déposer deux feuilles de papier filtre, de 200 x 200 mm chaque, dans la cuve et la fermer à l'aide de son couvercle. Pour assurer la saturation par la vapeur de la phase mobile, laisser la cuve de développement reposer dans l'obscurité pendant une à deux heures à la température ambiante.
2. Déposer 10 et 20 μ l de l'extrait obtenu selon 1.4.6., sur 2 points de départ d'une plaque à couche mince (1.1.2.) activée extemporanément pendant 1 heure à 60° C.
3. Déposer ensuite, sur des points de départ, chaque fois 4 μ l de l'une des solutions de référence mentionnées de 1.3.1. et 1.3.2.

REMARQUES :

- La distance entre les points de départ et le bord inférieur de la plaque à couche mince doit être d'environ 2 cm.
 - Les points de départ doivent également être équidistants de 2 cm environ.
4. A 15 cm des points de départ, tracer une ligne parallèle à la ligne de départ. Placer la plaque dans la cuve et la développer jusqu'à ce que la distance entre la ligne de départ et le front de solvant soit de 15 cm. La plaque doit également être développée dans l'obscurité.
 5. Retirer la plaque de la cuve et la laisser sécher à l'air.
 6. Dans une hotte, vaporiser la plaque à l'aide de la solution à 0,5 % (m/v) de 2,6-dichlorequinonchlorimide (1.2.17.) puis la placer pendant 10 à 15 minutes dans une étuve à 103 ± 2° C.

REMARQUE :

Pour rendre les gallates visibles, on peut, en lieu et place de 2,6-dichlorequinonchlorimide, utiliser une solution aqueuse à 1 % (m/v) de chlorure de fer (III).

7. Retirer la plaque de l'étuve et comparer sa coloration, de même que les valeurs Rf des taches des solutions de référence, avec celles de l'extrait déposé.
8. Des informations supplémentaires au sujet de l'identité des anti-oxydants peuvent être obtenues en plaçant, pendant 30 secondes environ, la plaque, refroidie jusqu'à la température ambiante, dans une cuve de développement saturée de vapeur d'ammoniaque.
9. Comparer, aux données figurant au tableau 1, les valeurs Rf x 100 ainsi que les teintes ou les modifications de coloration constatées après vaporisation à l'aide de 2,6.-dichlorequinonchlorimide ou après traitement par l'ammoniaque. Il ne faut toutefois pas attribuer de signification absolue aux valeurs Rf x 100 reprises dans ce tableau, car ces valeurs peuvent quelque peu varier d'une plaque à l'autre.

2. Tocophérols

2.1. Principe

L'extraction quantitative des tocophérols et de l'insaponifiable est exécutée selon les prescriptions existantes. (The Analyst 84, 356 (1959) - J.A.O.A.C. 49, 580 (1966).

La séparation des stérols sur florisil standardisé épure fortement les tocophérols de pics perturbateurs, dans l'analyse G.L.C.

Les tocophérols alpha, gamma et delta peuvent être séparés sans difficulté dans la fraction isolée qui renferme la totalité des tocophérols. L'adjonction d'un standard interne qui n'interfère pas avec les composants présents de la fraction à analyser, permet d'établir le rapport des tocophérols vis-à-vis du I.S. La conversion de la fraction exempte de stérol de l'insaponifiable en dérivés triméthyl silyle conduit à une bonne reproductibilité des réponses et à une récupération de plus de 90 % du tocophérol ajouté. Les réponses G.L.C. obtenues sont converties en rapports pondéraux après lecture sur une courbe d'étalonnage établie à l'aide de réactifs purs.

2.2. Réactifs

1. Solution alcoolique de pyrogallol frais à 5 % (v/v) dans de l'éthanol 96°
2. Solution alcoolique fraîche de KOH (30 ml d'éthanol + 3 ml de solution KOH (3 + 2)
3. Ethanol 96°
4. Ether diéthylique fraîchement distillé, anhydre et exempt de peroxyde

5. Florisil standardisé : laver du florisil à l'eau jusqu'à disparition du SO_2 . Sécher et activer à 260° pendant deux heures. Désactiver ensuite en ajoutant 10,5 ml d'eau par 100 g de florisil Agiter à plusieurs reprises le récipient hermétiquement fermé et le laisser reposer une nuit jusqu'à équilibre.
6. Sulfate de sodium anhydre p.a.
7. Hexane n fraîchement distillé, anhydre (point d'ébullition $68^\circ - 70^\circ$)
8. Chloroforme p.a.
9. N, O-bis (triméthylsilyl) acétamide - en abrégé : B.S.A.
10. Sulfure de carbone p.a.
11. Tocophérol alpha - pureté 99 % min. - doit être constitué à plus de 99 % d'un seul pic dans l'analyse G.L.C.
12. Dotriacontane - doit être constitué à plus de 99 % d'un seul pic dans l'analyse G.L.C.

2.3. Appareillage et verrerie

1. Chromatographe en phase gazeuse à température réglable pour l'injection, four et détecteur F.I.
2. Colonne de verre d'environ 2 m de longueur et de diamètre extérieur 1/4" remplie d'OV₁ environ 1 % sur gaschrom Q (100 - 120 mesh). Silaniser préalablement la colonne de verre, la remplir soigneusement de phase stationnaire et aménager pour "on-column injection".
3. Pipette d'injection de 10 microlitres (11)
4. Evaporateur rotatif pour évaporation à sec sous azote et pression réduite.
5. Colonnes de verre de 2,5 cm Ø, pourvues d'un robinet en téflon.
6. Ampoules à décanter de 250 et 500 ml, pourvues d'un robinet en téflon.
7. Ballons de 100 ml pourvus d'un réfrigérant à reflux.
8. Verrerie classique.

2.4. Mode opératoire

2.4.1. saponification de l'huile et extraction de l'insaponifiable

1. Peser 5 g d'huile dans un ballon de 100 ml et ajouter 20 ml de solution de pyrogallol.
2. Chauffer au bain-marie sous réfrigérant à reflux et ajouter, à température d'ébullition, 10 ml de solution KOH alcoolique. Saponifier pendant 20 minutes.
3. Transférer la solution encore chaude dans une ampoule à décanter de 250 ml, à l'aide de 100 ml d'eau.

4. Extraire l'insaponifiable par 100 ml d'éther diéthylique. En cas de mauvaise séparation, ajouter 1 à 2 ml d'éthanol. Après clarification complète, verser la couche éthérée dans une deuxième ampoule à décantier de 500 ml, contenant déjà 40 ml d'eau.
5. Extraire encore deux fois la solution saponifiée par 100 ml d'éther diéthylique et rassembler les extraits.
6. Mélanger prudemment les extraits avec de l'eau en évitant la formation d'émulsions.
7. Laver chaque fois par 40 ml d'eau jusqu'à réaction neutre en présence de phénolphtaléine.
8. Transférer la solution éthérée dans un ballon et distiller la majeure partie de l'éther sous pression réduite et en atmosphère d'azote.
9. Sécher le résidu par filtration sur une petite colonne avec du sulfate de sodium anhydre. Evaporer à sec, après lavage à l'éther.

2.4.2. Fractionnement du non-saponifiable sur colonne de florisil

1. Remplir une colonne à l'aide d'hexane et, par un entonnoir, verser 30 g de florisil désactivé dans l'hexane. Après décantation, déposer quelques cm de sulfate de sodium à la surface.
2. Laisser s'écouler, goutte à goutte, l'excès d'hexane et déposer l'insaponifiable sur la surface de la colonne, après l'avoir dissous dans quelques ml de chloroforme. Laisser le chloroforme ruisseler dans la colonne et laver.
3. Eluer successivement à l'aide de :
 - 40 ml d'hexane
 - 120 ml de solution d'éther diéthylique 5 % (v/v) dans de l'hexane
 - 120 ml de solution d'éther diéthylique 15 % (v/v) dans de l'hexaneLaisser successivement ruisseler, goutte à goutte, chacune des solutions dans la colonne et récupérer les éluats dans un seul récipient.
4. Distiller la majeure partie du solvant sous pression réduite et en atmosphère d'azote.
5. Ajouter un volume exactement mesuré d'une solution de docriacontane dans de l'éther diéthylique, de manière à ajouter à la fraction de tocophérol une quantité connue de standard interne (environ 20 mg).
6. Homogénéiser le contenu du ballon en l'agitant à quelques reprises et verser, dans un petit ballon, une quantité renfermant environ 20 mg de matière sèche.

7. Chasser le solvant à l'aide d'un courant modéré d'azote soufflant à la surface du liquide, tout en chauffant légèrement le ballon.
8. Ajouter au résidu sec 1 ml de B.S.A. et le placer, dans un ballon fermé par un bouchon de verre, pendant deux heures à l'étuve à 70°.
9. Chasser l'excès de B.S.A. par un courant modéré d'azote comme sous 2.4.2.7.
10. Dissoudre le résidu d'évaporation dans 1 ml de sulfure de carbone et placer le ballon bouché au réfrigérateur en attendant l'analyse G.L.C.

2.4.3. Analyse G.L.C. de la fraction de tocophérol

1. Entreprendre la chromatographie en phase gazeuse aux températures suivantes et régler comme suit les débits de gaz :
Température four : 240°
" injecteur : 260°
" détecteur : 260°
Azote (gaz vecteur) : environ 30 ml/min.
hydrogène : environ 30 ml/min.
2. Dans quatre ballons différents, peser soigneusement un mélange de tocophérol alpha et de dotriacontane, de manière à réaliser à peu près les rapports pondéraux dotriacontane/tocophérol suivants : 3, 2, 1 et 0,5.

En utilisant une microbalance, peser chaque fois environ 10 mg de tocophérol alpha et y adapter le poids de dotriacontane.
3. Silyler les mélanges selon 2.4.2.8.
4. Chasser l'excès de réactif selon 2.4.2.9.
5. Dissoudre les résidus d'évaporation selon 2.4.2.10.
6. Injecter 1 microlitre (μ l) de ces solutions et régler la sensibilité de l'électromètre et la vitesse du papier de l'enregistreur de manière à permettre l'intégration des pics aux conditions optimales. Calculer le rapport des pics.
7. Répéter plusieurs fois les injections, au moins pour l'une des solutions, en nombre suffisant pour permettre le calcul de la déviation standard. Si $\frac{S \times 100}{\bar{x}}$ n'excède pas 2 %, la reproductibilité peut être considérée comme satisfaisante.
8. Exprimer les valeurs obtenues des rapports des surfaces en relations pondérales pour les diverses solutions de référence. Etablir la courbe d'étalonnage qui, normalement, doit approcher une droite.

9. Effectuer les injections à l'aide des extraits inconnus de l'huile. Les temps relatifs de rétention par rapport au dotriacontane sont d'environ :

Pour le tocophérol alpha : 0,82

Tocophérol bêta et gamma : 0,67

Tocophérol delta : 0,55

10. En cas de doute au sujet de l'interférence possible de la référence interne avec des pics de l'insaponifiable, il est toujours possible d'effectuer l'injection de l'extrait silylé, sans adjonction d'I.S.

11. En cas de doute au sujet de l'interférence de certains pics de tocophérol avec d'autres composants de l'insaponifiable, l'injection peut également s'effectuer avant la silylation, ce qui conduit à d'autres temps de rétention.

2.4.4. Calcul

1. Calculer le rapport des surfaces du standard interne par rapport aux pics de tocophérol de l'huile à analyser.
2. Du rapport des surfaces, lire la relation pondérale sur la courbe d'étalonnage.
3. Calculer comme suit la teneur totale en tocophérols

$$\% \text{ tocophérols} = \frac{\text{dotriacontane mis en oeuvre}}{\text{relation pondérale}} \times \frac{100}{\text{huile mise en oeuvre}}$$

REMARQUE : On peut admettre que la réponse spécifique des différents tocophérols est analogue à celle du tocophérol alpha et que la courbe d'étalonnage, établie à l'aide de cette substance, s'applique également aux autres pics.

3. Butylhydroxyanisol (BHA, quantitatif)

3.1. Réactifs et appareillage

Sauf mention contraire expresse, tous les réactifs doivent être d'une qualité aussi pure que possible.

- Sulfate de sodium anhydre
- Huile d'olive exempte d'antioxydants (Oleum Olivae, Ned.Ph.Ed.VI)
- 3-BHA (*) ; 3-tert.butyle-4-hydroxyanisol
- Florisile, 60-100 mesh. Teneur en humidité déterminée par la titration Karl Fischer, environ 3 % (m/m)
- Mélange d'éther de pétrole-acétone. Mélanger 100 ml d'acétone et 900 ml d'éther de pétrole (40 - 60° C)
- Acide chlorhydrique 3 n
- Solution de nitrite de sodium 2 % (m/v). Préparer une solution fraîche chaque semaine.
- Solution d'hydroxyde de sodium. Dissoudre 40 grammes d'hydroxyde de sodium dans 500 ml d'eau distillée et ajouter 50 ml de méthanol. Mélanger, porter le volume à un litre avec de l'eau et mélanger à nouveau.
- Colonne pour chromatographie : longueur 400 mm, diamètre intérieur 20 mm. Déposer au fond de la colonne une petite couche de laine de verre silanisée et puis remplir la colonne de Florisile de manière à obtenir une colonne de Florisile de 4 cm de longueur. Recouvrir la colonne de Florisile d'une couche de sulfate de sodium anhydre de 1 à 1 ½ cm.
- Spectrophotomètre convenant pour la mesure à 480 nm.

3.2. Mode opératoire

1. Transférer quantitativement dans une ampoule à décantation de 150 ml, 10 grammes d'échantillon pesés à 1 mg près (à gramme) et ajouter 50 ml de mélange d'éther de pétrole-acétone.
2. Pipeter successivement 5 ml de solution de nitrite de sodium et 5 ml d'acide chlorhydrique 3 n dans l'ampoule à décantation, la fermer immédiatement à l'aide du bouchon approprié et agiter énergiquement pendant 30 secondes.
3. Evacuer la phase aqueuse après séparation des couches et extraire à deux reprises la phase organique successivement avec 20 et 5 ml de solution d'hydroxyde de sodium en agitant chaque fois énergiquement pendant 30 secondes. Recueillir les extraits alcaline dans une ampoule à décantation de 150 ml renfermant 15 ml d'acide chlorhydrique 3 n.

(*) Le BHA vendu dans le commerce est un mélange de 2- et 3-tert. butyle-4-hydroxyanisol. La différence en absorption maximale et absorption molaire entre les dérivés nitroso des deux isomères est faible au point d'être négligeable.

4. Extraire la solution aqueuse (3.2.3) à l'aide de 25 ml de mélange d'éther de pétrole-acétone, évacuer la phase aqueuse dans une ampoule à décantation de 150 ml et transférer la phase organique sur la colonne de Florisil.
5. Extraire une nouvelle fois la phase aqueuse (3.2.4.) à l'aide de 25 ml de mélange d'éther de pétrole-acétone et transférer également cette phase organique sur la colonne de Florisil dès que le premier extrait (3.2.4.) a pratiquement atteint la surface du contenu de la colonne.
6. Recueillir l'éluat de la colonne de Florisil (3.2.4. et 3.2.5.) dans une ampoule à décantation de 150 ml. Rincer les ampoules à décantation utilisées sous 3.2.4. et 3.2.5. à l'aide de 25 ml de mélange d'éther de pétrole-acétone et transférer également sur la colonne de Florisil le liquide de rinçage dès que le deuxième extrait (3.2.5.) a atteint la surface du contenu de la colonne, éluer. Recueillir également cet éluat dans l'ampoule à décantation de 150 ml.
7. Pipeter 40 ml de solution d'hydroxyde de sodium dans l'ampoule à décantation (3.2.6.), agiter énergiquement pendant 30 secondes et, après séparation des phases, transférer une partie de la phase alcaline dans une cuvette de 1 cm.
8. Mesurer l'extinction de la solution à 480 nm en présence de solution d'hydroxyde de sodium comme référence et noter, sur la courbe d'étalonnage (3.3.3.) la quantité afférente de butylhydroxyanisol en μg par ml de solution de mesure (b).

3.3. Courbe d'étalonnage

1. Préparer une solution de butylhydroxyanisol dans un mélange d'éther de pétrole-acétone renfermant 100 μg par ml.
2. Dans 5 ampoules à décantation de 150 ml, déposer 10 grammes d'huile d'olive et pipeter dans chacune des ampoules respectivement 0, 1, 2, 5 et 10 ml de solution de référence (3.3.1.). Ajouter à chaque ampoule à décantation, dans le même ordre de succession que ci-dessus, 50, 49, 48, 45 et 40 ml de mélange d'éther de pétrole-acétone et mélanger.
3. Traiter la solution selon 3.2.2. à 3.2.8., en ne prenant que 20 ml au lieu des 40 ml prescrits de solution d'hydroxyde de sodium (3.2.7.) et exprimer graphiquement les extinctions mesurées pour les solutions de référence comme fonction de la concentration de butylhydroxyanisol en μg par ml de solution mesurée. Tracer la ligne la plus appropriée par les points de mesure.

3.4. Calcul

1. Calculer la teneur en pour-cent (m/m) de butylhydroxyanisol dans l'échantillon par la formule

$$\frac{b}{a} \times 250$$

où :

a = le poids, en grammes, de l'échantillon mis en oeuvre (3.2.1.)

b = la quantité de butylhydroxyanisol en μg par ml de solution mesurée notée sur la courbe d'étalonnage (3.2.8.).

4. BHT

La détermination du BHT sera réglée dans une décision ultérieure.

II. Colorants

Voir Décision M (76) 11 concernant l'application d'une méthode de référence Benelux pour la recherche et l'identification des colorants synthétiques liposolubles présents dans les denrées alimentaires.

III. Antimousseant

La détermination du diméthylpolysiloxane suivra.

IV. Degré d'acidité et acides gras libres

Indice d'acide

Par indice d'acide on entend le nombre de mg d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans 1 g d'huile ou de graisse.

Réactifs :

- Mélange d'éthanol et d'éther.
Mélanger des volumes égaux d'éthanol 96 % v/v et d'éther diéthylique.
Neutraliser ce mélange immédiatement avant l'emploi à l'aide d'hydroxyde de potassium 0,1 n dans de l'éthanol, après adjonction de 0,3 ml de solution d'indicateur par 100 ml du mélange.
- Hydroxyde de potassium 0,1 n dans de l'éthanol 96 % v/v.
Etablir le titre de cette solution immédiatement avant l'emploi.
La solution doit être préparée au moins 5 jours par avant et décantée dans un flacon en verre sombre muni d'un bouchon en caoutchouc.
La solution doit être incolore ou jaune paille.
Il est recommandable de purifier l'éthanol utilisé pour la préparation de la solution, en faisant bouillir doucement, pendant une heure, 1 l d'éthanol et 5 à 10 g d'hydroxyde de potassium en distillant ensuite.
- Hydroxyde de potassium 0,5 n dans de l'éthanol 96 % v/v.
Comme la solution 0,1 n.
- Solution d'indicateur : dissoudre 1 g de phénolphtaléine dans 100 ml d'éthanol 96 % v/v.
Pour les huiles foncées : dissoudre 2 g de bleu alcalin 68 dans 100 ml d'éthanol 96 % v/v.

Mode opératoire :

1. Dans un vase conique de 250 ml, peser, à 0,01 g près, 5 à 10 g de l'échantillon à examiner.

2. Dissoudre l'échantillon dans 150 ml environ du mélange neutralisé d'éthanol et d'éther.

Si la solution obtenue n'est pas parfaitement limpide, ajouter une quantité supplémentaire du mélange d'éthanol et d'éther jusqu'à obtention d'une solution limpide.

3. Titrer jusqu'au virage de l'indicateur la solution obtenue en l'agitant avec la solution 0,1 n d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol contenue dans une burette graduée en 0,1 ml. La coloration rose de la phénolphtaléine doit persister pendant 10 secondes au moins.
4. Si la quantité utilisée d'hydroxyde de potassium 0,1 n dépasse 20 ml, répéter la détermination en utilisant la solution 0,5 n d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol.

Calcul

l'indice d'acide est : $\frac{V \times 56,1}{M}$,

où :

V = le volume, en ml, de solution n hydroxyde de potassium dans l'éthanol utilisé pour le titrage ,

M = la masse, en g, de l'échantillon mis en oeuvre.

Remarques :

Si la solution se trouble pendant le titrage, ajouter une quantité supplémentaire du mélange d'éthanol et d'éther.

Le bleu alcalin 6B peut être utilisé comme indicateur pour les huiles foncées dont la couleur ne permet pas d'apercevoir nettement le virage de la phénolphtaléine. Dans ce cas aussi, la coloration obtenue après virage de l'indicateur du bleu au rouge doit persister au moins pendant 10 secondes.

Pour les huiles et graisses contenant de l'acide laurique, la température du mélange d'éthanol et d'éther doit se situer entre 15 et 20° C pendant le titrage.

Acides gras libres, exprimés en acide oléique

La détermination s'effectue comme décrit ci-dessus.

La teneur en acides gras libres, exprimée en acide oléique est calculée comme suit :

$$\frac{28,2 \times V}{M} \%$$

où V et M ont la même signification que pour le calcul de l'indice d'acide.

V. Matières volatiles

Par matières volatiles, on entend l'eau et autres composants, déterminés par perte de masse, en chauffant à 105° C.

1.1. Appareillage :

- Capsule à fond plat, diamètre de 8 à 9 cm, profondeur d'environ 3 cm (plaque de Pétri)
- Thermomètre gradué de 80 à 110° C, long d'environ 10 cm, muni d'un vase d'expansion au-dessus du réservoir de mercure
- Bain de sable ou plaque chauffante.

1.2. Mode opératoire :

1. Déterminer le poids d'une capsule à fond plat ayant fait l'objet d'une prèdesiccation et où se trouve un thermomètre court.
2. Poser dans la capsule environ 20 g de l'échantillon et peser à 0,01 g près.
3. Chauffer la capsule et son contenu sur un bain de sable ou sur une plaque chauffante, en élevant la température d'environ 10° C par minute jusqu'à 90° C. Agiter constamment avec le thermomètre.
4. Augmenter, en agitant constamment, lentement la température à 103 ± 2° C. Prévenir des projections afin de ne pas perdre une partie de l'échantillon. Ne pas dépasser 105° C. Continuer à agiter en remuant le thermomètre sur le fond de la capsule jusqu'au moment où tout dégagement de bulles a cessé.
5. Pour s'assurer que toute l'eau a été éliminée, répéter plusieurs fois le chauffage à 103 ± 2° C, en le séparant par des refroidissements jusqu'à 95° C.
6. Laisser refroidir dans un exsiccateur jusqu'à la température ambiante et peser.
7. Répéter les opérations ci-dessus jusqu'à ce que la différence entre les résultats de deux pesées successives n'excèdent pas 0,002 g.

1.3. Calcul :

La teneur en matières volatiles à 105° C est égale à :

$$\text{où : } \frac{(M_1 - M_2) \times 100}{M_0} \%$$

M_0 = la masse en grammes, de l'échantillon mis en oeuvre.

M_1 = la masse en grammes, de la capsule et du contenu avant le chauffage.

M_2 = la masse en grammes, de la capsule et du contenu après chauffage jusqu'à masse constante.

Remarque

Une augmentation de la masse de l'échantillon après un chauffage répété indique qu'une auto-oxydation de l'huile ou de la graisse a eu lieu. Dans ce cas, prendre comme résultat la pesée effectuée immédiatement avant que la masse ne commence à augmenter.

VI. Identification de l'huile d'olive vierge

1. Coefficient d'extinction spécifique à 270 nm (K_{270})

Le coefficient d'extinction spécifique de l'huile d'olive à 270 nm (K_{270}) est l'extinction d'une solution de 1 gramme d'huile dans 100 ml de 2,2,4.-triméthylpentane, mesurée à 270 nm dans une cuvette de 1 cm [$E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (270 nm)].

1.1. Appareillage et réactifs :

- Spectrophotomètre.
- Cuvettes de quartz, chemin optique 10 mm.
- 2,2,4.-triméthylpentane (iso-octane) analytiquement pur.
La transmission en pour-cent, mesurée à 270 nm par rapport à l'eau prise comme référence, doit être d'au moins 98 %.
- ballons jaugés de 100 ml.
- Balance analytique.

1.2. Mode opératoire :

1. Peser 1 gramme d'huile à 1 mg près et le transférer quantitativement avec de l'iso-octane dans un ballon jaugé de 100 ml.
2. Compléter jusqu'au trait à l'aide d'iso-octane et mélanger.
3. Transférer une partie de la solution à mesurer (1.2.) dans une cuvette de quartz à chemin optique de 1 cm et mesurer l'absorption de la solution à 270 nm contre l'iso-octane comme référence (K_{270}).

2. Coefficient d'extinction spécifique de l'huile d'olive à 270 nm après traitement à l'oxyde d'aluminium désactivé

La définition du coefficient d'extinction spécifique de même que sa mesure sont identiques à celles décrites sous 1. Toutefois, avant la mesure, l'huile d'olive est traitée à l'oxyde d'aluminium basique.

2.1. Traitement à l'oxyde d'aluminium désactivé :

1. Dans une cuvette de porcelaine, chauffer pendant 3 heures à 380-400° C, de l'oxyde d'aluminium basique portant la mention de qualité pour chromatographie dont les granules ont une dimension entre 30 et 130 μm (dimension moyenne 80 μm). Ajuster l'activité de l'oxyde d'aluminium requise pour la recherche, en ajoutant 5 ml d'eau à 100 grammes et en mélangeant soigneusement à plusieurs reprises. Conserver le mélange pendant une nuit dans un récipient hermétiquement fermé ; l'oxyde d'aluminium est ainsi prêt à l'emploi.

2. Contrôler comme suit l'activité de l'oxyde d'aluminium obtenu selon 2.1.1.

Déposer 30 grammes d'oxyde d'aluminium obtenu selon 2.1.1. dans une colonne pour chromatographie ayant un diamètre intérieur de 35 mm et une longueur de 450 mm et dotée d'un tube d'évacuation dont le diamètre intérieur est d'environ 10 mm. Tapoter prudemment la partie inférieure de la colonne contre une surface de bois jusqu'à ce que le niveau du contenu de la colonne ne s'abaisse plus. Confectionner un mélange de 95 % d'huile d'olive vierge ayant un coefficient d'extinction spécifique inférieur à 0,18 et de 5 % d'huile d'arachide traitée à l'argile smectique dont le coefficient d'extinction spécifique est d'au moins 4 (1.). Dissoudre 10 grammes de ce mélange dans 100 ml d'hexane n et éluer sur la colonne. Recueillir l'éluat dans un ballon approprié et évaporer le solvant sous vide à une température ne dépassant pas 25° C. Déterminer le coefficient d'extinction spécifique du résidu de la façon énoncée sous 1. Ce coefficient doit être d'au moins 0,11. Si cette condition n'est pas remplie - les triènes conjugués ne sont pas élués - il faut préparer un oxyde d'aluminium plus désactivé (ajouter davantage d'eau sous 2.1.1.) et contrôler à nouveau l'activité de la façon décrite ci-dessus.

3. Déposer 30 grammes de l'oxyde d'aluminium basique désactivé obtenu selon 2.1.1., dans une colonne décrite sous 2.1.2. et la remplir de la manière qui y est également décrite. Confectionner une solution de 10 grammes de l'huile à examiner dans 100 ml d'hexane n et l'éluer sur la colonne. Evaporer le solvant selon 2.1.2. et déterminer le coefficient d'extinction spécifique du résidu à 270 nm selon 1.2.

3. Détermination de la variation du coefficient d'extinction spécifique (ΔK)

La variation du coefficient d'extinction spécifique ΔK est définie comme suit :

$$\Delta K = K_m - 0,5 (K_{m-4} + K_{m+4})$$

où

K_m = le coefficient d'extinction spécifique mesuré au maximum d'absorption à environ 270 nm.

K_{m+4} et K_{m-4} = les coefficients d'extinction spécifique mesurés à des longueurs d'ondes déplacées de 4 nm au-dessus et en dessous de la longueur d'onde du maximum d'absorption.

REMARQUE :

Si le spectre ne présente pas de maximum aux abords de 270 nm, les coefficients d'extinction sont mesurés à 270, 266 et 274 nm.

3.1. Mode opératoire

1. Mesurer le spectre UV de la solution obtenue selon 1.2.1. et déterminer les coefficients d'extinction spécifiques K_m , K_{m+4} et K_{m-4}
2. Si la courbe d'absorption ne présente pas de maximum, il faut opérer comme indiqué sous REMARQUE ci-dessus.

VII. Détection de l'huile résiduaire dans l'huile d'olive

1. Réaction Bellier

1.1. Appareillage et réactifs

- Ballons jaugés de 100 et 500 ml
- Réfrigérant à reflux
- Pipette calibrée de 5 ml avec étalonnage en 0,1 ml
- Thermomètre échelonné de 15 à 60° C
- Solution d'hydroxyde de potassium. Dissoudre 42,5 grammes d'hydroxyde de potassium dans 72 ml d'eau distillée, compléter jusqu'au trait dans un ballon jaugé de 500 ml à l'aide d'éthanol 96 % (v/v) et mélanger.
- Ethanol 70 % (v/v).
- Solution d'acide acétique. Mélanger un volume d'acide acétique et 2 volumes d'eau. Titrer 1,5 ml de la solution à l'aide de la solution d'hydroxyde de potassium précitée ; indicateur:phénolphthaléine L'utilisation de solution d'hydroxyde de potassium doit être exactement de 5 ml. Dans la négative, il faut ajuster la solution d'acide acétique à cette valeur à l'aide d'acide acétique ou d'eau.

1.2. Préparation de l'échantillon

Au besoin, chauffer prudemment l'huile jusqu'à liquéfaction de tous les composants solidifiés et filtrer sur un filtre plissé pour éliminer l'eau présente.

1.3. Mode opératoire

1. Pipeter 1 ml de l'échantillon dans un ballon de 100 ml et ajouter 5 ml de solution d'hydroxyde de potassium.
2. Placer un réfrigérant à reflux sur le ballon et faire bouillir le contenu pendant 10 minutes sous reflux. Mélanger le contenu de temps à autre en l'agitant.
3. Refroidir à la température ambiante et ajouter 1,5 ml de solution d'acide acétique ainsi que 50 ml d'éthanol 70 % (v/v) chauffé à 50° C.
4. Mélanger soigneusement, placer le thermomètre dans la solution et laisser refroidir. Examiner la solution dès que sa température est descendue à 45° C. La réaction à l'huile résiduaire est positive si, au cours du refroidissement de la solution, un précipité floconneux se forme pendant le passage de la température de 45 à 40° C.

REMARQUE : S'il se forme un précipité non floconneux, il faut conserver la solution (1.3.4.) pendant au moins 24 heures et au besoin pendant 48 heures à 20 à 22° C. Si un précipité floconneux se forme à ce moment, la réaction est seulement positive.

VIII. Recherche de la présence d'autres huiles dans l'huile d'olive :
analyse de la fraction stérolique des corps gras

1. Principe

Analyse par chromatographie en phase gazeuse des stérols séparés par chromatographie sur couche mince à partir de l'insanonifiable séché avec précaution.

2. Appareillage

1. appareillage pour la chromatographie sur couche mince, comprenant en particulier quatre plaques de verre de 20 x 20 x 0,4 cm, deux de 20 x 5 x 0,4 cm et une microseringue de 0,1 ml
2. bécber de 50 ml
3. filtres poreux, porosité 3, diamètre 15 mm
4. ballon de 100 ml
5. éprouvette de centrifugeuse à fond conique de 10 ml, munie d'un bouchon rodé
6. pipettes graduées de 1 ml
7. appareil de chromatographie en phase gazeuse, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme avec un injecteur en argent ou en verre ou système d'injection directe sur la colonne et relié à un enregistreur
8. colonne de chromatographie en phase gazeuse, en verre ou en acier inoxydable en U ou spirale, de 1 à 2 m de long et de 3 à 4 mm de diamètre intérieur; phase stationnaire de gomme de silicone (type méthyl (1)) stable jusqu'à au moins 300°C, imprégnant au taux de 2 à 4 % une terre de diatomée calcinée, lavée aux acides et silanisée, de granulométrie 80/100 ou 100/120 mesh.

Remarque : certains types d'acier inoxydable pouvant provoquer des résultats erronés par détérioration des stérols, le verre est recommandé

9. microseringue pouvant fournir des volumes atteignant 5 ou 10 μ l.

3. Réactifs

1. chloroforme pour chromatographie
2. benzène pour chromatographie
3. heptane
4. gel de silice (par exemple Kieselgel G)
5. Solution de référence pour la chromatographie sur plaque constituée de cholestérol à 5 % dans le chloroforme

(1) Par exemple SE 30.

6. acétone pour chromatographie
 7. solution à 0,1 % dans l'alcool éthylique absolu de sel sodique de 2'7' dichlorofluorescéine
 8. pyridine
 9. hexaméthylsilazane
 10. triméthyl chlorosilane
 11. solution pour le test de sensibilité : 1 mg de cholestérol par ml de n-pentane
 12. solution pour le test de la résolution des pics : 0,9 mg de phytostérols d'huile de colza et 0,1 mg de cholestérol par ml de n-pentane. Les stérols doivent être fraîchement préparés selon le procédé décrit sous B du mode opératoire
 13. solution pour le test de référence : 1 mg de phytostérols d'huile de tourneol par ml de n-pentane, fraîchement préparés comme cela est décrit sous B du mode opératoire.
4. Préparation des plaques pour chromatographie

Placer dans l'ordre, sur l'étaleur, une plaque 20 x 5 x 0,4 cm, quatre plaques 20 x 20 x 0,4 cm et une plaque 20 x 5 x 0,4 cm.

Dans un ballon de 500 ml à col large, placer 40 g de gel de silice et environ 80 ml d'eau. Agiter avec une baguette en verre, éventuellement avec un agitateur mécanique en verre jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Eliminer les gaz éventuels en faisant le vide à l'aide d'une trompe à eau pendant une minute au moins. Porter ensuite la suspension sur l'étaleur tout en réglant l'épaisseur à 0,5 mm et recouvrir uniformément les plaques. Laisser sécher les plaques à l'air pendant quinze minutes environ et sécher ensuite dans une étuve à 105° C pendant deux heures. Conserver les plaques ainsi préparées dans un dessiccateur sous vide.

5. Mode opératoire

5.1. Préparation du l'insaponifiable

Introduction

On désigne sous le nom d'insaponifiable les substances solubles dans la matière grasse, lesquelles, après saponification, sont insolubles dans l'eau et solubles dans le solvant utilisé pour le dosage. Il comprend les constituants naturels des matières grasses (stérols, alcools, hydrocarbures), ainsi que les substances organiques non volatiles à 100° C (huiles minérales) étrangères aux matières grasses qu'elles peuvent éventuellement contenir. Comme solvant, on utilise l'éther de pétrole ou bien l'oxyde d'éthyle. Il faut tenir compte que les résultats avec les deux solvants sont, dans la plupart des cas, différents et qu'on trouve des teneurs en % plus élevées avec l'oxyde d'éthyle. Pour l'huile d'olive, compte tenu des conditions climatiques où se trouvent la majorité des laboratoires d'analyses, l'éther de pétrole a été reconnu comme le solvant à employer.

5.2. Méthode à l'éther de pétrole

Matériel

- ballon d'environ 150 ml pouvant être adapté à un réfrigérant à reflux
- ampoules à décantier d'environ 500 ml
- étuve réglée à $103^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$.

Réactifs

- solution éthanolique de KOH environ 2 N dans l'éthanol à 95 % (v/v).
Le réactif ne devra pas être plus foncé que la couleur jaune paille
- éther de pétrole distillant entre 40 et 60°C , possédant un indice de brome inférieur à 1, exempt de résidu.

Mode opératoire

Peser exactement à 0,01 g près environ 5 g de matière grasse dans le ballon. Ajouter 50 ml de la solution éthanolique de KOH environ 2 N. Adapter au réfrigérant à reflux. Chauffer une heure à légère ébullition. Arrêter le chauffage. Ajouter par le haut du réfrigérant environ 50 ml d'eau distillée et agiter.

Transvaser après refroidissement dans une ampoule à décantier et rincer le ballon à plusieurs reprises, avec au total environ 50 ml d'éther de pétrole.

Agiter énergiquement pendant une minute.

Laisser reposer jusqu'à séparation complète des deux phases et recueillir la solution savonneuse dans une seconde ampoule à décantation. S'il se forme, par exception, une émulsion, la détruire par addition de petites quantités d'éthanol ou de solution concentrée d'hydroxyde de potassium.

Répéter l'extraction de la solution savonneuse encore deux fois avec chaque fois environ 50 ml d'éther de pétrole.

Réunir les 3 fractions étherées dans une même ampoule, les laver à trois reprises avec environ 50 ml d'éthanol à 50 % (v/v).

Par le haut de l'ampoule, transvaser, en plusieurs fois si nécessaire, quantitativement la solution d'éther de pétrole dans un ballon de 250 ml taré (en effectuant des petits rinçages de l'ampoule avec de l'éther de pétrole).

Le solvant est éliminé en le chauffant prudemment sous vide, les résidus sont séchés à une température inférieure à 50°C sous vide, en vue d'éviter des oxydations indésirables.

5.3. Séparation de la fraction stérolique par chromatographie sur couche mince

Introduire dans la cuve de développement le mélange heptane n-acétone 85/15 ou benzène/acétone 95/5 (v/v) jusqu'à hauteur d'1 cm environ ; fermer à l'aide du couvercle et laisser reposer pendant trois heures au moins de façon que l'équilibre liquide/vapeur s'établisse. Il est également conseillé de fixer sur les surfaces intérieures de la chambre des bandes de papier filtre qui plongent dans l'éluant. Cette précaution offre l'avantage de réduire d'un tiers environ la durée de migration du front du liquide et de faire éluer les composants de façon plus uniforme.

Préparer entre-temps une solution à 5 % d'insaponifiable extrait à l'éther de pétrole dans le chloroforme. Déposer 0,3 ml environ de cette solution à l'aide de la microseringue de 0,1 ml sur la plaque chromatographique à 1,5 cm environ du bord inférieur, en bande continue et uniforme de façon à obtenir une ligne de départ la plus mince possible. Selon la technique habituelle, déposer à une extrémité de la plaque quelques ml de la solution de référence contenant du cholestérol afin d'identifier le Rf de la fraction stérolique.

Placer la plaque dans la cuve de développement préparée comme indiqué ci-dessus. La température ambiante doit être de 20° C environ. Fermer avec le couvercle et développer jusqu'à ce que le front du solvant soit arrivé à 1 cm environ du bord supérieur de la plaque. Retirer la plaque de la chambre de développement et laisser évaporer le solvant dans un courant d'azote chaud.

Révéler en vaporisant uniformément et avec précaution la solution alcoolique de sel sodique de la 2'7' dichlorofluorescéine sur la plaque. En examinant la plaque à l'ultraviolet, on détermine la position des stérols grâce à l'alignement avec la tache de cholestérol provenant de la solution de référence. Récupérer en grattant à l'aide d'une spatule métallique la bande des stérols. Introduire le gel de silice détaché dans un bécher de 50 ml avec 15 ml de chloroforme chaud, agiter et transférer la totalité de gel de silice sur le creuset filtrant et filtrer.

Laver trois fois le filtre chaque fois avec une portion de 15 ml de chloroforme chaud, tout en recueillant le filtrat dans un ballon de 100 ml.

Évaporer la solution chloroformique jusqu'à 4 à 5 ml et la verser dans le tube à centrifuger muni d'un bouchon rodé, taré au préalable. Sécher en évaporant le solvant par un léger réchauffement dans un courant d'azote et peser la fraction stérolique ainsi obtenue.

5.4. Analyse chromatographique en phase gazeuse des stérols

1. Préparation des triméthylsilyléthers (TMSE).

Pour chaque mg de stérol, ajouter dans l'éprouvette 0,02 ml de réactif pour la silanisation, composé d'un mélange de pyridine-hexaméthyl-disilazane-triméthylchlorosilane 9/3/1 (v/v/v) en ayant soin d'éviter toute trace d'humidité. Placer l'éprouvette dans un dessiccateur pendant trente minutes environ, puis fermer, centrifuger pendant quelques minutes. Prélever, pour l'analyse à pratiquer ensuite, la solution restante.

2. Conditions de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse

Température de la colonne : 220 à 250° C.

Température du système d'injection s'il est chauffé séparément : 20 à 40° C au-dessus de la température de la colonne. Débit de l'azote : 30 à 60 ml par minute. Déconnecter le détecteur et équilibrer les nouvelles colonnes dans ces conditions pendant seize à vingt-quatre heures. Connecter le détecteur, allumer la flamme et régler les débits d'hydrogène, d'oxygène ou d'air de façon à obtenir une hauteur de flamme et une sensibilité convenables. Mettre en marche l'enregistreur et laisser se dérouler le papier à une vitesse appropriée ; ajuster le zéro et l'atténuateur. Si la ligne de base est stable, l'appareil est prêt à être utilisé.

3. Test de sensibilité

Prélever 5 ml de la solution du test de sensibilité, évaporer le solvant, traiter comme indiqué en 1 ; injecter 0,1 à 0,2 μ l de la solution ainsi préparée (TMSE). Un pic de cholestérol doit seul apparaître sur le chromatogramme.

Régler l'atténuateur de façon à utiliser approximativement toute l'échelle de l'enregistreur.

4. Test de résolution des pics

Prélever 5 ml de la solution préparée pour le test de résolution.

Evaporer le solvant, traiter comme indiqué en 1.

Injecter 0,1 à 0,2 μ l de la solution ainsi préparée (TMSE)

Les pics de cholestérol, de brassicastérol, de campestérol et de β -sitostérol doivent apparaître sur le chromatogramme. Mesurer les distances de rétention (distance du point d'injection au point de hauteur maximal du pic) des pics, d_{CH} pour le cholestérol, d_B pour le brassicastérol, d_C pour le campestérol et d_S pour le β -sitostérol et les largeurs à la base des pics (longueur de rétention entre les intersections avec la ligne de base des tangentes aux points d'inflexion situés sur les côtés avant et arrière du pic) ω_{CH} pour le cholestérol et ω_B pour le brassicastérol. La résolution des pics, exprimée par la formule

$$PR = 2 \frac{(d_B - d_{CH})}{\omega_B + \omega_{CH}}$$

doit être égale au moins à 1.

Calculer les temps de rétention relatifs (cholestérol = 1,00) pour le brassicastérol, le campestérol et le β -sitostérol.

5. Test de référence

Prélever 5 ml de la solution du test de référence, évaporer le solvant, traiter comme indiqué en 1, injecter 0,1 à 0,2 µl de la solution ainsi préparée (TMSE). Les pics de campestérol, de stigmastérol, de β-sitostérol et Δ7 stigmastérol doivent apparaître sur le chromatogramme.

Mesurer les distances de rétention des pics, d_c pour le campestérol, d_{ST} pour le stigmastérol, d_s pour le β-sitostérol et $d_{ST} - 7$ pour le Δ7 stigmastérol.

Calculer les temps de rétention relatifs qui sont approximativement :

cholestérol :	1,0
brassicastérol :	1,1
campestérol :	1,3
stigmastérol :	1,4
β-sitostérol :	1,6 (1)
Δ 7 stigmastérol :	1,8 (2)

6. Analyse

Injecter 0,1 à 0,2 µl de la solution TMSE des stérols à analyser et enregistrer le chromatogramme.

5.5. Expression des résultats

1. Pour l'interprétation de la composition de la fraction stérolique analysée, il ne faut pas relever des pics ayant des temps de rétention différents de ceux déterminés expérimentalement pour les 6 stérols susmentionnés.

La teneur en % en β-sitostérol est donnée par la formule :

$$\frac{\text{Aire du pic du } \beta\text{-sitostérol}}{\text{Somme des aires des six pics de stérols}} \times 100$$

2. Par rapport à la composition en % des stérols totaux, le contenu :

- a) en β-sitostérol ne devra pas être inférieur à 93 % ;
- b) en cholestérol et en Δ7 stigmastérol ne devra pas être supérieur à 0,5 % pour chacun de ces composants ;
- c) en campestérol ne devra pas être supérieur à 4 % ;
- d) en stigmastérol devra être inférieur au campestérol.

- (1) Si d'autres stérols ont, comme le Δ5 avenastérol, dans ces conditions, le même volume de rétention que le β-sitostérol, ils sont comptés comme du β-sitostérol.
- (2) Si d'autres stérols ont, dans ces conditions, le même volume de rétention que le Δ7 stigmastérol, ils sont comptés comme du Δ7 stigmastérol.