



MÉTHODE D'ANALYSE

DÉTERMINATION DE LA DIFFÉRENCE ENTRE LA COMPOSITION RÉELLE ET THÉORIQUE DES TRIGLYCÉRIDES À ECN 42

1. Objet

Détermination de la différence absolue entre les valeurs expérimentales des triglycérides (TG) à nombre équivalent d'atomes de carbone égal à 42 (ECN_{CLHP}) obtenues par détermination dans l'huile par chromatographie liquide haute performance (CLHP) et la valeur théorique des TG à nombre équivalent d'atomes de carbone égal à 42 ($ECN_{42\text{théorique}}$), calculée d'après la composition en acides gras.

2. Domaine d'application

La méthode s'applique aux huiles d'olive. Elle vise à détecter la présence de faibles quantités d'huiles de graines (riches en acide linoléique) dans chaque catégorie d'huile d'olive.

3. Principe

Dans le cas des huiles pures, la composition des triglycérides à ECN 42 déterminée par CLHP est plus ou moins équivalente à la composition théorique des triglycérides à ECN 42 (calculée à partir de la composition en acides gras déterminée par chromatographie en phase gazeuse). Une différence supérieure aux valeurs adoptées pour chaque catégorie d'huile d'olive indique que l'huile contient des huiles de graines.

4. Méthode

La méthode permettant de calculer la composition théorique des triglycérides à ECN 42 ainsi que la différence par rapport aux données CLHP consiste essentiellement en la coordination des résultats d'analyse obtenus par d'autres méthodes. On distingue trois

phases : la détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG), le calcul de la composition théorique des triglycérides à ECN 42 et la détermination des triglycérides à ECN 42 par CLHP.

4.1. Appareillage

- 4.1.1 Ballons à fond rond de 250 et 500 ml
- 4.1.2 Bêchers de 100 ml
- 4.1.3. Colonne de chromatographie en verre (diamètre intérieur : 21 mm, longueur : 450 mm) avec robinet et cône normalisé (femelle) au sommet
- 4.1.4. Ampoules à décanter de 250 ml avec cône normalisé (mâle) à la base, pouvant s'adapter au sommet de la colonne
- 4.1.5. Baguette en verre de 600 mm de longueur
- 4.1.6. Entonnoir en verre de 80 mm de diamètre
- 4.1.7. Fioles jaugées de 50 ml
- 4.1.8. Fioles jaugées de 20 ml
- 4.1.9. Évaporateur rotatif
- 4.1.10. Chromatographe en phase liquide à haute performance, équipé d'un réglage thermostatique de la température de la colonne
- 4.1.11. Vannes d'injection pour 10 µl
- 4.1.12 Détecteur réfractomètre différentiel. La sensibilité pleine échelle doit atteindre au moins 10^{-4} unités d'indice de réfraction
- 4.1.13 Colonne : tube en acier inoxydable de 250 mm de longueur et de 4,5 mm de diamètre intérieur, rempli de particules de silice de 5 µm de diamètre, avec 22 à 23% de carbone sous forme d'octadécylsilane*
- 4.1.14 Logiciel de traitement des données.
- 4.1.15 Flacons d'environ 2 ml, avec bouchons à vis et septa en téflon

*Exemples de colonne : Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333
 Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art 50377 ou équivalent

4.2. Réactifs

Les réactifs doivent être de pureté analytique. Les solvants d'élution doivent être dégazés et peuvent être recyclés plusieurs fois sans que cela ait une incidence sur les séparations.

- 4.2.1. Éther de pétrole 40-60° C pour chromatographie ou hexane. L'hexane peut être remplacé par de l'isooctane (2,2,4-triméthyl pentane pour chromatographie), à condition de fournir des valeurs de précision comparables (voir *Valeurs de précision de la méthode avec*

l'utilisation d'isooctane à la page 22). Les solvants ayant un point d'ébullition plus élevé que le n-hexane sont plus longs à évaporer, mais leur utilisation est recommandée en raison de la toxicité de l'hexane.

- 4.2.2. Éther éthylique, exempt de peroxydes, fraîchement distillé
- 4.2.3. Solvant d'élution pour la purification de l'huile par chromatographie sur colonne : mélange d'éther de pétrole/éther éthylique selon les proportions 87:13 (v/v)
- 4.2.4. Gel de silice, granulométrie 70-230, type Merck 7734, à teneur en eau normalisée de 5% (m/m)
- 4.2.5. Laine de verre
- 4.2.6. Acétone pour CLHP
- 4.2.7. Acétonitrile pour CLHP
- 4.2.8. Solvant d'élution pour CLHP : acétonitrile + acétone (proportions à ajuster pour obtenir la séparation souhaitée : commencer avec un mélange 50:50) ou propionitrile
- 4.2.9. Solvant de solubilisation : acétone
- 4.2.10. Triglycérides de référence : soit des triglycérides que l'on trouve dans le commerce (tripalmitine, trioléine, etc.) ; dans ce cas, les temps de rétention sont reportés sur un diagramme en fonction du nombre équivalent d'atomes de carbone ; soit des chromatogrammes de référence obtenus pour de l'huile de soja, pour un mélange 30:70 d'huile de soja et d'huile d'olive, et pour de l'huile d'olive pure (voir Notes 1 et 2 et Figures 1, 2, 3, 4).
- 4.2.11. Colonne d'extraction en phase solide avec phase de silice 1 g, 6 ml
- 4.2.12. Heptane pour chromatographie. L'heptane peut être remplacé par de l'isooctane (2,2,4-triméthyl pentane pour chromatographie)

4.3. Préparation des échantillons

Étant donné qu'un certain nombre de substances peuvent interférer et donner lieu à des résultats faux positifs, l'échantillon doit toujours être purifié comme indiqué aux points 4.3.1 et 4.3.2 ci-dessous (purification sur colonne de gel de silice) ou 4.3.3 (purification sur gel de silice SPE).

4.3.1 Purification sur colonne de gel de silice - Préparation de la colonne de chromatographie

Remplir la colonne (4.1.3.) avec 30 ml environ de solvant d'élution (4.2.3.) ; introduire ensuite un tampon de laine de verre (4.2.5.) dans la colonne et l'enfoncer jusqu'au fond de la colonne au moyen de la baguette en verre (4.1.5.).

Préparer dans un bécher de 100 ml une suspension avec 25 ml de gel de silice (4.2.4.) dans 80 ml de mélange d'élution (4.2.3.) ; la transférer ensuite dans la colonne au moyen d'un entonnoir en verre (4.1.6.).

Afin de s'assurer que la totalité du gel de silice a été transférée dans la colonne, laver le bécher avec le mélange d'élution et transférer également le liquide de lavage dans la colonne.

Ouvrir le robinet et laisser le solvant s'écouler jusqu'à ce que son niveau se situe à environ 1 cm au-dessus du gel de silice.

4.3.2 Purification sur colonne de gel de silice - Chromatographie sur colonne

Peser, avec un degré de précision de 0,001g, $2,5 \pm 0,1$ g d'huile, préalablement filtrée, homogénéisée et, si nécessaire, déshydratée, dans une fiole jaugée de 50 ml (4.1.7.).

Diluer dans environ 20 ml de solution d'élution (4.2.3.) ; si nécessaire, chauffer légèrement pour faciliter la dissolution. Refroidir à température ambiante et porter au volume avec du solvant d'élution.

À l'aide d'une pipette jaugée, introduire 20 ml de solution préparée conformément au point 4.3.1., ouvrir le robinet et éluer le solvant jusqu'au niveau supérieur de la silice dans la colonne.

Éluer ensuite avec 150 ml de solvant d'élution (4.2.3.), en réglant le débit du solvant à 2 ml par minute environ (de telle sorte que 150 ml s'écoulent dans la colonne en 60-70 minutes).

Recueillir l'éluat dans un ballon à fond rond de 250 ml (4.1.1.) préalablement taré et placé dans un four et le peser avec précision. Éliminer le solvant sous pression réduite dans un évaporateur rotatif (4.1.9.) et peser le résidu qui sera utilisé pour préparer la solution pour l'analyse CLHP et pour la préparation des esters méthyliques.

Après passage dans la colonne, l'échantillon doit être récupéré à 90% au moins pour les catégories d'huile d'olive vierge extra, vierge, huile d'olive courante, huile d'olive raffinée et huile d'olive, et à 80% au moins pour les huiles d'olive vierges lampantes et les huiles de grignons d'olive.

4.3.3 Purification par extraction en phase solide

Activer la colonne d'extraction en phase solide sur silice (4.2.11) en passant 6 ml d'hexane (4.2.1) sous vide, en évitant la dessiccation.

Peser 0,12 g avec un degré de précision de 0,001 g dans un flacon de 2 ml (4.1.15) et dissoudre dans 0,5 ml d'hexane (4.2.1).

Charger la colonne d'extraction en phase solide avec la solution et éluer avec 10 ml de mélange hexane-éther diéthylique (87:13 v/v) (4.2.3) sous vide.

Les éluats combinés sont homogénéisés et divisés en deux volumes similaires. Les fractions recueillies sont évaporées à sec dans un évaporateur rotatif (4.1.9) sous pression réduite à température ambiante. La première partie aliquote est dissoute dans 1 ml d'heptane. La solution est prête pour la préparation des esters méthyliques d'acides gras et l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

La deuxième partie aliquote est évaporée et le résidu est dissous dans 1 ml d'acétone (4.2.6) en vue de l'analyse des triglycérides par CLHP (4.4).

4.4. Analyse CLHP

4.4.1. Préparation des échantillons pour l'analyse chromatographique

Préparer une solution à 5% de l'échantillon à analyser en pesant $0,5 \pm 0,001$ g de l'échantillon dans une fiole jaugée de 10 ml et compléter à 10 ml avec le solvant de solubilisation (4.2.9.).

4.4.2. Procédure

Régler le système chromatographique. Pomper du solvant d'élution (4.2.8.) à un débit de 1,5 ml par minute de façon à purger l'ensemble du système. Attendre d'avoir une ligne de base stable.

Injecter 10 μ l de l'échantillon préparé selon le point 4.3.

4.4.3. Calcul et expression des résultats

Utiliser la méthode de normalisation des aires des pics, qui consiste à admettre que la somme des aires des pics correspondant aux triglycérides (TG) de ECN 42 à ECN 52 (inclus) est égale à 100%.

Calculer le pourcentage relatif de chaque triglycéride selon la formule :

$$\% \text{ triglycéride} = \text{aire du pic} \times 100 / \text{somme des aires des pics}$$

Les résultats doivent comporter au moins deux chiffres après la virgule.

Voir Notes 1, 2, 3 et 4.

4.5. Calcul de la composition des triglycérides (% de moles) à partir de la composition en acides gras (% de l'aire)

4.5.1. Détermination de la composition en acides gras

La composition en acides gras est déterminée selon la méthode « Détermination des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse » COI/T.20/Doc. n° 33/Rev.1 2017.

4.5.2. Acides gras pris en considération dans le calcul

Les triglycérides sont regroupés selon leur nombre équivalent d'atomes de carbone (ECN), compte tenu des équivalences suivantes entre ECN et acides gras. Seuls les acides gras à 16 ou 18 atomes de carbone ont été pris en considération, car ce sont les seuls qui sont importants pour l'huile d'olive. Les acides gras doivent être normalisés à 100%.

Acide gras (AG)	Abréviation	Poids moléculaire (PM)	ECN
Acide palmitique	P	256,4	16
Acide palmitoléique	Po	254,4	14
Acide stéarique	S	284,5	18
Acide oléique	O	282,5	16
Acide linoléique	L	280,4	14
Acide linoléique	Ln	278,4	12

4.5.3. Conversion en moles du % de l'aire pour tous les acides gras

$$\left. \begin{array}{lll}
 \text{moles P} = \frac{\% \text{ aire P}}{\text{PM P}} & \text{moles S} = \frac{\% \text{ aire S}}{\text{PM S}} & \text{moles Po} = \frac{\% \text{ aire Po}}{\text{PM Po}} \\
 \text{moles O} = \frac{\% \text{ aire O}}{\text{PM O}} & \text{moles L} = \frac{\% \text{ aire L}}{\text{PM L}} & \text{moles Ln} = \frac{\% \text{ aire Ln}}{\text{PM Ln}}
 \end{array} \right\} (1)$$

4.5.4. Normalisation à 100% des moles d'acide gras

$$\left. \begin{array}{l}
 \% \text{ moles P (1,2,3)} = \frac{\text{moles P} * 100}{\text{moles (P +S +Po +O +L +Ln)}} \\
 \% \text{ moles S (1,2,3)} = \frac{\text{moles S} * 100}{\text{moles (P +S +Po +O +L +Ln)}} \\
 \% \text{ moles Po (1,2,3)} = \frac{\text{moles Po} * 100}{\text{moles (P +S+Po+O +L +Ln)}} \\
 \% \text{ moles O (1,2,3)} = \frac{\text{moles O} * 100}{\text{moles (P +S+Po +O +L +Ln)}} \\
 \% \text{ moles L (1,2,3)} = \frac{\text{moles L} * 100}{\text{moles (P +S +Po +O +L +Ln)}} \\
 \% \text{ moles Ln (1,2,3)} = \frac{\text{moles Ln} * 100}{\text{moles (P +S +Po +O +L+Ln)}}
 \end{array} \right\} (2)$$

Le résultat indique le pourcentage de chaque acide gras, en moles, dans la position globale (1,2,3) des TG.

On calcule ensuite la somme des acides gras saturés P et S (AGS) et des acides gras insaturés Po, O, L et Ln (AGI) :

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles AGS} &= \% \text{ moles P} + \% \text{ moles S} \\ \% \text{ moles AGI} &= 100 - \% \text{ moles AGS.} \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

4.5.5. Calcul de la composition des acides gras en position 2 et en position 1, 3 des TG

Les acides gras sont répartis en trois groupes, comme suit : un groupe pour la position 2 et deux groupes identiques pour les positions 1 et 3, avec des coefficients différents pour les acides gras saturés (P et S) et les acides gras insaturés (Po, O, L et Ln).

4.5.5.1. Acides gras saturés en position 2 [P(2) et S(2)]

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles P (2)} &= \% \text{ moles P (1,2,3)} * 0,06 \\ \% \text{ moles S (2)} &= \% \text{ moles S (1,2,3)} * 0,06 \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

4.5.5.2. Acides gras insaturés en position 2 [(Po(2), O(2), L(2) et Ln(2)]

$$\left. \begin{aligned} \% \text{ moles Po (2)} &= \frac{\text{moles \% Po (1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * (100 - \text{moles \% P (2)} - \text{moles \% S (2)}) \\ \% \text{ moles O (2)} &= \frac{\text{moles \% O (1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * (100 - \text{moles \% P (2)} - \text{moles \% S (2)}) \\ \% \text{ moles L (2)} &= \frac{\text{moles \% L (1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * (100 - \text{moles \% P (2)} - \text{moles \% S (2)}) \\ \% \text{ moles Ln (2)} &= \frac{\text{moles \% Ln (1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * (100 - \text{moles \% P (2)} - \text{moles \% S (2)}) \end{aligned} \right\} \quad (5)$$

4.5.5.3 Acides gras en positions 1 et 3 [(P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) et Ln(1,3)]

$$\begin{aligned} \% \text{moles P(1,3)} &= \frac{\text{moles \% P(1,2,3)} - \text{moles \% P(2)}}{2} + \text{moles \% P(1,2,3)} \\ \% \text{moles S(1,3)} &= \frac{\text{moles \% S(1,2,3)} - \text{moles \% S(2)}}{2} + \text{moles \% S(1,2,3)} \\ \% \text{moles Po(1,3)} &= \frac{\text{moles \% Po(1,2,3)} - \text{moles \% Po(2)}}{2} + \text{moles \% Po(1,2,3)} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \% \text{moles P(1,3)} \\ \% \text{moles S(1,3)} \\ \% \text{moles Po(1,3)} \end{aligned}} \right\} (6)$$

$$\begin{aligned} \% \text{moles O(1,3)} &= \frac{\text{moles \% O(1,2,3)} - \text{moles \% O(2)}}{2} + \text{moles \% O(1,2,3)} \\ \% \text{moles L(1,3)} &= \frac{\text{moles \% L(1,2,3)} - \text{moles \% L(2)}}{2} + \text{moles \% L(1,2,3)} \\ \% \text{moles Ln(1,3)} &= \frac{\text{moles \% Ln(1,2,3)} - \text{moles \% Ln(2)}}{2} + \text{moles \% Ln(1,2,3)} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \% \text{moles O(1,3)} \\ \% \text{moles L(1,3)} \\ \% \text{moles Ln(1,3)} \end{aligned}} \right\} (6)$$

4.5.6. Calcul des triglycérides

4.5.6.1. TG à un acide gras (AAA, ici LLL, PoPoPo)

$$\% \text{moles AAA} = \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% A(1,3)}}{10.000} \quad \left. \vphantom{\% \text{moles AAA}} \right\} (7)$$

4.5.6.2 TG à deux acides gras (AAB, ici PoPoL, PoLL)

$$\begin{aligned} \% \text{moles AAB} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% B(1,3)} * 2}{10.000} \\ \% \text{moles ABA} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% B(2)} * \text{moles \% A(1,3)}}{10.000} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \% \text{moles AAB} \\ \% \text{moles ABA} \end{aligned}} \right\} (8)$$

4.5.6.3. TG à trois acides gras distincts (ABC, ici OLLn, PLLn, PoOLn, PPOLn)

$$\begin{aligned}
 \% \text{moles ABC} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% B(2)} * \text{moles \% C(1,3)} * 2}{10.000} \\
 \% \text{moles BCA} &= \frac{\text{moles \% B(1,3)} * \text{moles \% C(2)} * \text{moles \% A(1,3)} * 2}{10.000} \\
 \% \text{moles CAB} &= \frac{\text{moles \% C(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% B(1,3)} * 2}{10.000}
 \end{aligned}
 \tag{9}$$

4.5.6.4. Triglycérides à ECN 42

Les triglycérides à ECN42 sont calculés selon les équations 7, 8 et 9 et sont ensuite indiqués par ordre d'élution attendu en CLHP (en général, on observe seulement trois pics).

LLL

PoLL et l'isomère de position LPoL

OLLn et les isomères de position OLnL et LnOL

PoPoL et l'isomère de position PoLPo

PoOLn et les isomères de position OPON ET OLnPo

PLLn et les isomères de position LLnP et LnPL

PoPoPo

SLnLn et l'isomère de position LnSLn

PPoLn et les isomères de position PLnPpo et PoPLn

Les triglycérides à ECN42 s'obtiennent en additionnant les neuf glycérides, y compris leurs isomères de position. Les résultats doivent comporter au moins deux chiffres après la virgule.

5. Évaluation des résultats

On compare la composition théorique calculée et celle déterminée par CLHP. Si, en valeur absolue, la différence « données CLHP moins données théoriques » est supérieure aux valeurs spécifiées pour la catégorie d'huile concernée dans la norme de commercialisation, l'échantillon contient de l'huile de graines.

Les résultats sont exprimés avec deux décimales.

6. Exemple (la numération renvoie aux sections du texte de la méthode)

6.1. Calcul du % de moles d'acides gras à partir des données de la CPG (% de l'aire normalisé)

La détermination de la composition en acides gras par CPG donne les valeurs suivantes :

AG	P	S	Po	O	L	Ln
PM	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
% aire	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

6.2. Conversion en moles du % de l'aire pour tous les acides gras

$$\text{moles P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles P}$$

$$\text{moles S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles S}$$

$$\text{moles Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles Po}$$

$$\text{moles O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles O}$$

$$\text{moles L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles L}$$

$$\text{moles Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ moles Ln}$$

$$\text{Total} = 0,35821 \text{ moles TG}$$

} voir formule (1)

6.3. Normalisation à 100% des moles d'acides gras

$$\% \text{ moles P(1,2,3)} = \frac{0.03900 \text{ moles P} \cdot 100}{0.35821 \text{ moles}} = 10.887\%$$

$$\% \text{ moles S(1,2,3)} = \frac{0.01054 \text{ moles S} \cdot 100}{0.35821 \text{ moles}} = 2.942\%$$

$$\% \text{ moles Po(1,2,3)} = \frac{0.00393 \text{ moles Po} \cdot 100}{0.35821 \text{ moles}} = 1.097\%$$

$$\% \text{ moles O(1,2,3)} = \frac{0.26549 \text{ moles O} \cdot 100}{0.35821 \text{ moles}} = 74.116\%$$

$$\% \text{ moles L(1,2,3)} = \frac{0.03566 \text{ moles L} \cdot 100}{0.35821 \text{ moles}} = 9.955\%$$

$$\% \text{ moles Ln(1,2,3)} = \frac{0.00359 \text{ moles Ln} \cdot 100}{0.35821 \text{ moles}} = 1.002\%$$

$$\text{Total \% moles} = 100,0\%$$

Somme des acides gras saturés et insaturés en position 1,2 et 3 des TG :

$$\% \text{ moles AGS} = 10,887\% + 2,942\% = 13,829\%$$

$$\% \text{ moles AGI} = 100,000\% - 13,829\% = 86,171\%$$

} voir formule (2)

} voir formule (3)

6.4. Calcul de la composition en acides gras en position 2 et en position 1 et 3 des TG**6.4.1. Acides gras saturés en position 2 [P(2) et S(2)]**

$$\% \text{ moles P(2)} = 10,887\% \cdot 0,06 = 0,653 \%$$

$$\% \text{ moles S(2)} = 2,942\% \cdot 0,06 = 0,177 \%$$

} voir formule (4)

6.4.2. Acides gras insaturés en position 2 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) et Ln(1,3)]

$$\% \text{ moles Po(2)} = \frac{1.097\%}{86.171\%} \cdot (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \%$$

$$\% \text{ moles O(2)} = \frac{74.116\%}{86.171\%} \cdot (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \%$$

$$\% \text{ moles L(2)} = \frac{9.955\%}{86.171\%} \cdot (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \%$$

$$\% \text{ moles Ln(2)} = \frac{1.002\%}{86.171\%} \cdot (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \%$$

} voir formule (5)

6.4.3. Acides gras en position 1 et 3 [P(1,3), S(1,3),Po(1,3), O(1,3), L(1,3) et Ln(1,3)]

$$\begin{aligned} \% \text{ moles P(1,3)} &= \frac{10.887 - 0.653}{2} + 10,887 = 16,004 \% \\ \% \text{ moles S(1,3)} &= \frac{2.942 - 0.177}{2} + 2,942 = 4,325 \% \\ \% \text{ moles Po(1,3)} &= \frac{1.097 - 1.262}{2} + 1,097 = 1,015 \% \\ \% \text{ moles O(1,3)} &= \frac{74.116 - 85.296}{2} + 74,116 = 68,526 \% \\ \% \text{ moles L(1,3)} &= \frac{9.955 - 11.457}{2} + 9,955 = 9,204 \% \\ \% \text{ moles Ln(1,3)} &= \frac{1.002 - 1.153}{2} + 1,002 = 0,927 \% \end{aligned}$$

} voir formule (6)

6.5. Calcul des triglycérides

À partir de la composition calculée en acides gras en position 2 et en position 1,3 :

AG en	positions 1 et 3	position 2
P	16,004%	0,653%
S	4,325%	0,177%
Po	1,015%	1,262%
O	68,526%	85,296%
L	9,204%	11,457%
Ln	0,927%	1,153%
Total	100,0%	100,0%

Les triglycérides suivants sont calculés :

- LLL
- PoPoPo
- PoLL avec 1 isomère de position
- SLnLn avec 1 isomère de position
- PoPoL avec 1 isomère de position
- PPoLn avec 2 isomères de position
- OLLn avec 2 isomères de position
- PLLn avec 2 isomères de position
- PoOLn avec 2 isomères de position

6.5.1 TG à un acide gras (LLL, PoPoPo)

voir formule (7)

$$\% \text{ mol LLL} = \frac{9.204\% * 11.457\% * 9.204\%}{10,000} = \underline{\underline{0,09706 \text{ mol LLL}}}$$

$$\% \text{ mol PoPoPo} = \frac{1.015\% * 1.262\% * 1.015\%}{10,000} = \underline{\underline{0,00013 \text{ mol PoPoPo}}}$$

6.5.2 TG à deux acides gras (PoLL, SLnLn, PoPoL)

voir formule (8)

$$\% \text{ mol PoLL+LLPo} = \frac{1.015\% * 11.457\% * 9.204\% * 2}{10,000} = 0,02141$$

$$\% \text{ mol LPoL} = \frac{9.204\% * 1.262\% * 9.204\%}{10,000} = 0,01069$$

0,03210 mol PoLL

$$\% \text{ mol SLnLn+LnLnS} = \frac{4.325\% * 1.153\% * 0.927\% * 2}{10,000} = 0,00092$$

$$\% \text{ mol LnSLn} = \frac{0.927\% * 0.177\% * 0.927\%}{10,000} = 0,00002$$

0,00094 mol SLnLn

$$\% \text{ mol PoPoL+LPoPo} = \frac{1.015\% * 1.262\% * 9.204\% * 2}{10,000} = 0,00236$$

$$\% \text{ mol PoLPo} = \frac{1.015\% * 11.457\% * 1.015\%}{10,000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

6.5.3 TG à trois acides gras distincts (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) voir formule (9)

$$\% \text{ mol PPoLn} = \frac{16.004\% * 1.262\% * 0.927\% * 2}{10,000} = 0,00374$$

$$\% \text{ mol LnPPo} = \frac{0.927\% * 0.653\% * 1.015\% * 2}{10,000} = 0,00012$$

$$\% \text{ mol PoLnP} = \frac{1.015\% * 1.153\% * 16.004\% * 2}{10,000} = 0,00375$$

0,00761 mol PPoLn

$$\% \text{ mol OLLn} = \frac{68.526\% * 11.457\% * 0.927\% * 2}{10,000} = 0,14556$$

$$\% \text{ mol LnOL} = \frac{0.927\% * 85.296\% * 9.204\% * 2}{10,000} = 0,14555$$

$$\% \text{ mol LLnO} = \frac{9.204\% * 1.153\% * 68.526\% * 2}{10,000} = 0,14544$$

0,43655 mol OLLn

$$\% \text{ mol PLLn} = \frac{16.004\% * 11.457\% * 0.927\% * 2}{10,000} = 0,03399$$

$$\% \text{ mol LnPL} = \frac{0.927\% * 0.653\% * 9.204\% * 2}{10,000} = 0,00111$$

$$\% \text{ mol LLnP} = \frac{9.204\% * 1.153\% * 16.004\% * 2}{10,000} = 0,03397$$

0,06907 mol PLLn

$$\% \text{ mol PoOLn} = \frac{1.015\% * 85.296\% * 0.927\% * 2}{10,000} = 0,01605$$

$$\% \text{ mol LnPoO} = \frac{0.927\% * 1.262\% * 68.526\% * 2}{10,000} = 0,01603$$

$$\% \text{ mol OLnPo} = \frac{68.526\% * 1.153\% * 1.015\% * 2}{10,000} = 0,01604$$

$$\underline{\underline{0,04812 \text{ mol PoOLn}}}$$
$$\underline{\underline{\text{ECN42} = 0,69512 \text{ mol TG}}}$$

Note 1 : il est possible de déterminer l'ordre d'élution en calculant le nombre équivalent d'atomes de carbone, souvent défini par la relation $\text{ECN} = \text{CN} - 2n$, dans laquelle CN est le nombre d'atomes de carbone et n le nombre de doubles liaisons ; on peut affiner le calcul en tenant compte de l'origine de la double liaison. Si n_0 , n_1 et n_{in} sont les nombres de doubles liaisons attribués respectivement aux acides oléique, linoléique et linoléique, le nombre équivalent d'atomes de carbone peut être calculé selon la formule suivante :

$$\text{ECN} = \text{CN} - d_0 n_0 - d_1 n_1 - d_{in} n_{in}$$

dans laquelle les coefficients d_0 , d_1 et d_{in} peuvent être calculés à l'aide des triglycérides de référence. Dans les conditions spécifiées dans la présente méthode, la relation obtenue sera voisine de :

$$\text{ECN} = \text{CN} - (2,60 n_0) - (2,35 n_1) - (2,17 n_{in})$$

Note 2 : Avec plusieurs triglycérides de référence, il est également possible de calculer la résolution par rapport à la trioléine :

$$\alpha = \text{TR}^1 / \text{TR de la trioléine}$$

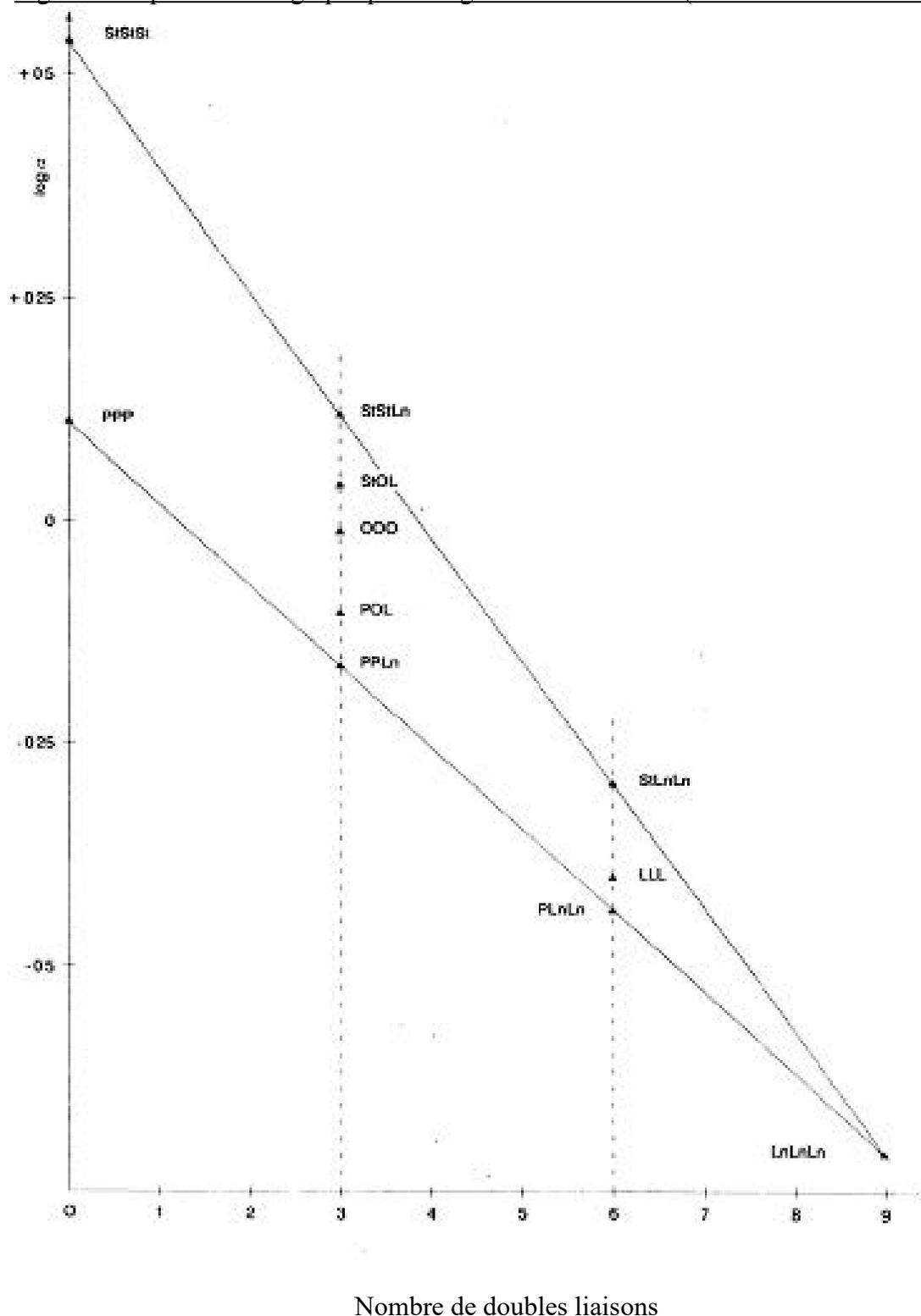
en utilisant le temps de rétention réduit $\text{TR}^1 = \text{TR} - \text{TR du solvant}$.

La représentation graphique de $\log \alpha$ en fonction de f (nombre de doubles liaisons) permet de déterminer les valeurs de rétention pour tous les triglycérides à acides gras contenus dans les triglycérides de référence (voir Figure 1).

Note 3: L'efficacité de la colonne doit permettre de séparer nettement le pic de la trilinoléine des pics des triglycérides dont le TR est proche. L'élution est effectuée jusqu'au pic ECN 52.

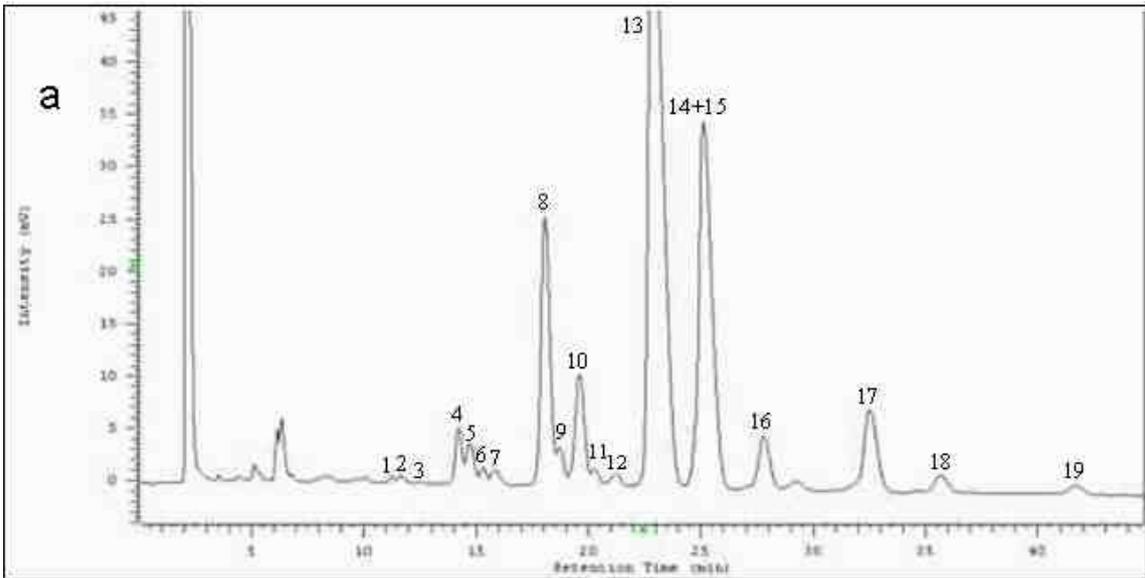
Note 4: Une mesure correcte des aires de tous les pics intéressants pour la présente détermination est garantie si le deuxième pic correspondant à ECN 50 est égal à 50% du maximum de l'échelle.

Figure 1: Représentation graphique de $\log \alpha$ en fonction de f (nombre de doubles liaisons)



La : acide laurique ; My : acide myristique ; P : acide palmitique ; St : acide stéarique ;
O : acide oléique ; L : acide linoléique ; Ln : acide linoléique.

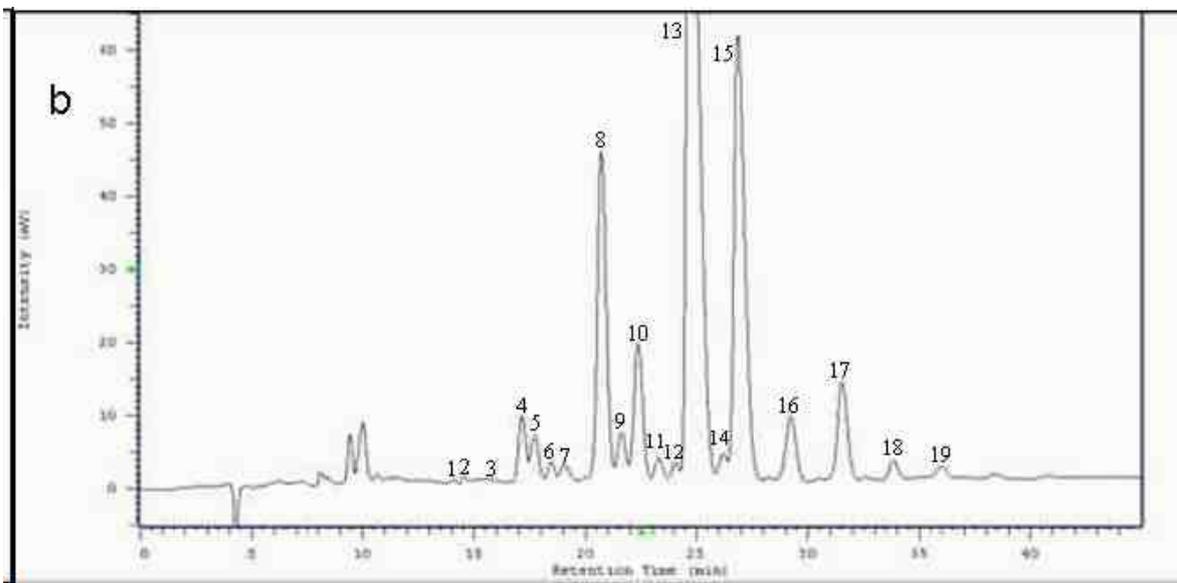
Figure 2 : Huile d'olive à faible teneur en acide linoléique



Solvant : Acétone/Acétonitrile.

Tracé a : Principaux composants des pics chromatographiques : **ECN42** :

(1) LLL+PoLL ; (2) OLLn+PoOLn ; (3) PLLn ; **ECN44** : (4) OLL+PoOL ; (5) OOLn+PLL ; (6) POLn+PPoPo ; (7) OOL+PoOO ; **ECN46** : (8) OOL+LnPP ; (9) PoOO ; (10) SLL+PLO ; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo ; (12) PLP ; **ECN48** : (13) OOO+PoPP ; (14+15) SOL+POO ; (16) POP ; **ECN50** : (17) SOO ; (18) POS+SLS.

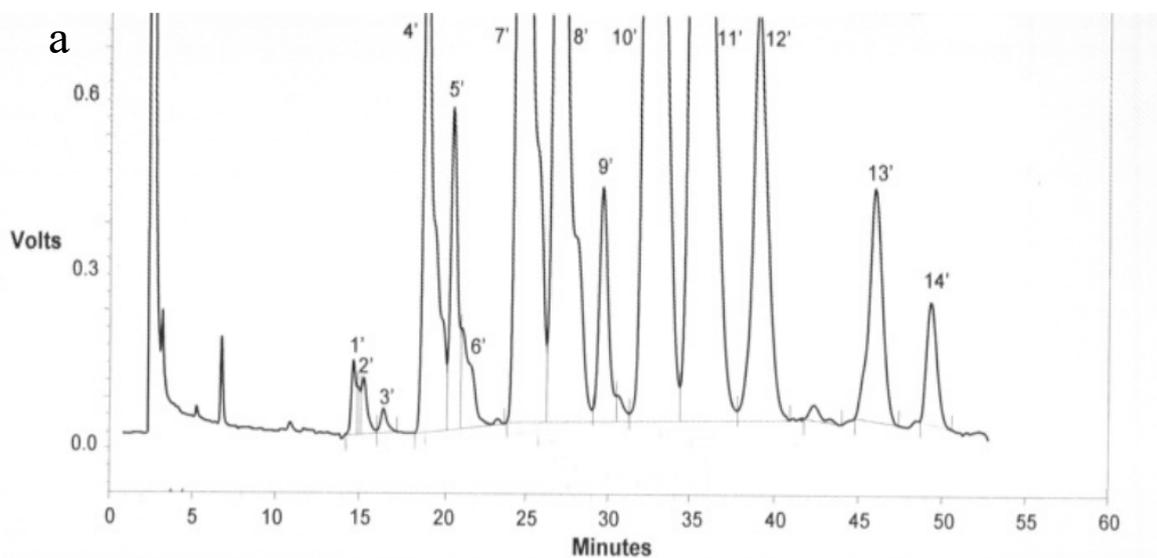


Solvant : Propionitrile

Tracé b : Principaux composants des pics chromatographiques : **ECN42** : (1) LLL ;

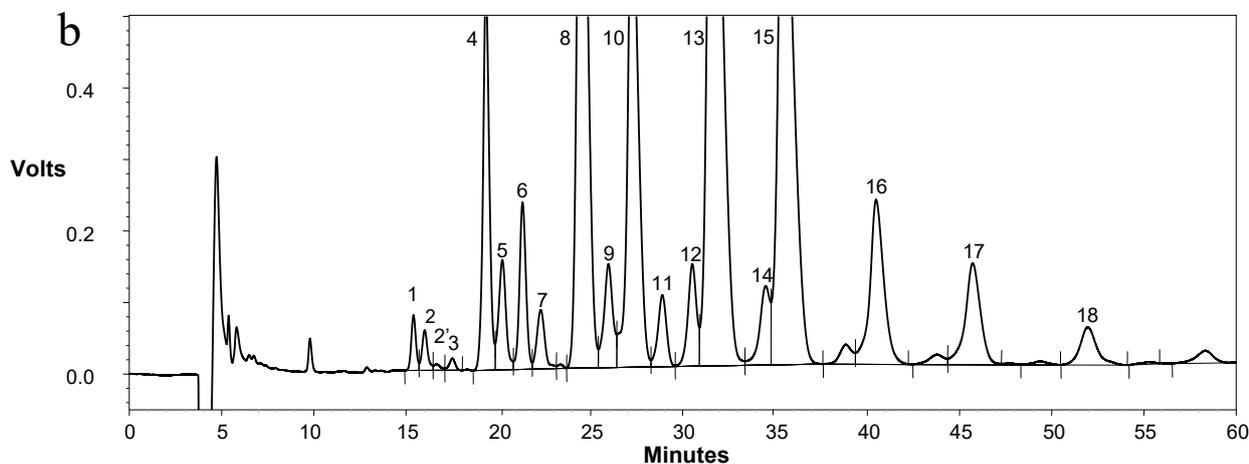
(2) OLLn+PoLL ; (3) PLLn ; **ECN44** : (4) OLL ; (5) OOLn+PoOL ; (6) PLL+PoPoO ; (7) POLn+PPoPo+PPoL ; **ECN46** : (8) OOL+LnPP ; (9) PoOO ; (10) SLL+PLO ; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo ; (12) PLP ; **ECN48** : (13) OOO+PoPP ; (14) SOL ; (15) POO ; (16) POP ; **ECN50** : (17) SOO ; (18) POS+SLS

Figure 3 : Huile d'olive à teneur élevée en acide linoléique



Solvant : Acétone/Acétonitrile (50:50).

Tracé a : Principaux composants des pics chromatographiques : **ECN42** : (1') LLL+PoLL ; (2') OLLn+PoOLn ; (3') PLLn ; **ECN44** : (4') OLL+PoOL ; (5') OOLn +PLL ; (6') POLn+PPoPo ; **ECN46** : (7') OOL+PoOO ; (8') PLO+SLL+ PoOP ; (9') PLP+PoPP ; **ECN48** : (10') OOO ; (11') POO+SLL+PPoO ; (12') POP+PLS ; **ECN50** : (13') SOO ; (14') POS+SLS



Solvant : Propionitrile.

Tracé b : Principaux composants des pics chromatographiques : **ECN42** : (1) LLL ; (2+2') OLLn+PoLL ; (3) PLLn ; **ECN44** : (4) OLL ; (5) OOLn+PoOL ; (6) PLL+PoPoO ; (7) POLn+PPoPo+PPoL ; **ECN46** : (8) OOL+LnPP ; (9) PoOO ; (10) SLL+PLO ; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo ; **ECN48** : (12) PLP ; (13) OOO+PoPP ; (14) SOL ; (15) POO ; (16) POP ; **ECN50** : (17) SOO ; (18) POS+SLS ; **ECN52** : (19) AOO.

MARGES DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE

1. Analyse des résultats de l'essai collaboratif déterminés avec l'acétone et l'acétonitrile

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

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

L'essai a porté sur cinq échantillons :

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

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

Le tableau mentionne les 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 au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur l'échantillon identique soumis à l'essai, dans le même laboratoire par 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 au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels obtenus à l'aide de la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant un appareillage différent

S_R Écart-type de reproductibilité

RSD_R (%) Coefficient de variation de reproductibilité (S_R x 100 / mean)

Tableau 1 : Différence entre la composition réelle et théorique des triglycérides à ECN 42

	A	B	C	D	E
n	19	19	19	19	19
outliers	1	0	0	0	3
mean	0,04	1,66	0,04	0,18	0,82
r	0,08	0,12	0,09	0,11	0,11
S_r	0,02	0,04	0,03	0,04	0,04
RSD_r(%)	82,2 _(non sig.)	2,8	76,1 _(non sig.)	22,5	5,1
R	0,12	0,25	0,16	0,22	0,24
S_R	0,05	0,09	0,05	0,08	0,08
RSD_R(%)	127,6 _(non sig.)	5,4	132,2 _(non sig.)	46,2	10,9

2. Analyse des résultats de l'essai collaboratif avec le propionitrile

L'essai a été réalisé sur quatre échantillons :

A : 70% d'huile d'olive vierge + 10% d'huile de grignons d'olive raffinée + 20% d'huile de tournesol à teneur élevée en acide oléique.

B : 80% d'huile d'olive vierge à teneur élevée en campestérol + 20% d'oléine de palme

C : 100% d'huile d'olive vierge

D : 70% d'huile d'olive vierge + 15% d'huile de grignons d'olive raffinée + 15% d'huile de tournesol à teneur élevée en acide oléique

Tableau 2 : Données de validation du ΔECN42 calculé à partir de l'ECN42 expérimental déterminé avec le propionitrile.

	A	B	C	D
n	16	16	11	11
outliers	0	2	0	0
mean	1,07	0,10	0,06	0,84
r	0,05	0,02	0,06	0,06
S_r	0,02	0,01	0,02	0,02
RSD_r(%)	1,6	7,9	36,6	2,7
R	0,33	0,11	0,12	0,35
S_R	0,12	0,04	0,04	0,12
RSD_R(%)	11,2	36,8	78,6 _(non sig.)	14,8

3. Analyse des résultats de l'essai collaboratif du COI en 2017 pour l'essai d'aptitude

Un seul échantillon d'huile d'olive vierge, adultérée avec 10% d'huile d'olive raffinée et 2% de graisse animale, a été testé.

Δ ECN42	n	Moyenne consensus	S_r	S_R
Méthode réglementaire	21	0,03	0,004	0,013
Méthode solvant alternatif	23	0,03	0,006	0,019
Évaluation	Calculé	Limite	Conclusion/Commentaires	
Différence (Méthode réglementaire - Méthode solvant alternatif)	0,00			
Test F répétabilité	2,05	2,14	F cal < F limite	
Test F reproductibilité	2,12	2,14	F cal < F limite	
Reproductibilité courante Réglementaire	0,02	0,03	S_R obtenu est inférieur à S_R courant	
T Student	0,44	2	t cal < t limite	

La *méthode réglementaire* consiste à utiliser de l'hexane comme solvant.

La *méthode solvant alternatif* consiste à utiliser de l'isooctane comme solvant.

La comparaison des résultats s'est concentrée sur l'évaluation comparative des variances, à la fois dans des conditions de reproductibilité, ainsi que sur l'existence d'un biais significatif ou non entre les valeurs assignées après l'application de la méthode réglementaire et celles obtenues après l'utilisation du solvant alternatif.

À cette fin, le Fisher des deux variances obtenues a été calculé, dans les deux conditions, ainsi que la statistique t de Student des deux populations étudiées, qui compare les deux moyennes obtenues et leurs variances respectives, dans des conditions de reproductibilité.

La valeur de précision actuellement publiée pour le niveau étudié a également été comparée, ainsi que celle obtenue avec l'utilisation de solvants alternatifs.

2. Bibliographie

ISO 5725-1:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 1: Principes généraux et définitions

ISO 5725-2: 1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-5: 1998 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 5: Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée

ISO 5725-6:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 6: Utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude

LOGICIEL