

DÉTERMINATION DE LA DIFFÉRENCE ENTRE LA COMPOSITION REELLE ET THÉORIQUE DES TRIGLYCÉRIDES A ECN 42

1. Objet

Détermination de la différence entre la composition théorique des triglycérides TG à ECN 42, en terme d'indice d'équivalent carbone 42 ($ECN\ 42_{théorique}$), calculée à partir de la composition en acides gras, et les résultats expérimentaux ($ECN42_{HPLC}$), obtenus par analyse directe de l'huile par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC).

2. Champ d'application

La norme s'applique aux huiles d'olive. La méthode 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

La composition des triglycérides à ECN 42 déterminée expérimentalement par HPLC ou de façon théorique calculée à partir de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG) donne dans certaines limites pour l'huile d'olive authentique, des résultats équivalents. Une différence supérieure aux valeurs adoptées pour chaque catégorie d'huile indique que l'huile contient des huiles de graines.

4. Méthode

La méthode permettant de calculer la différence entre la composition théorique et expérimentale des triglycérides à ECN 42 comprend trois phases :

- détermination de la composition en acides gras par CPG
- Calcul de la composition théorique des triglycérides à ECN 42 par HPLC.
- détermination de la composition des triglycérides à ECN 42

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 en verre pour chromatographie (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. Ballons tarés de 50 ml
- 4.1.8. Ballons tarés de 20 ml
- 4.1.9. Évaporateur rotatif
- 4.1.10. Chromatographe en phase liquide haute performance, équipé d'un chauffe colonne thermostatique
- 4.1.11. Boucles d'injection chromatographique pour 10 µl
- 4.1.12 Détecteur chromatographique de type réfractomètre différentiel. La sensibilité pleine échelle doit atteindre au moins 10^4 unités d'indice de réfraction
- 4.1.13 Colonne chromatographique d'acier inoxydable de 250 mm de longueur et de 4,5 mm de diamètre interne, rempli de particules de silice de 5 µm de diamètre, avec 22 à 23% de carbone sous forme de greffons octadécyl*
- 4.1.14 Enregistreur-intégrateur du signal.

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

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 les séparations n'en soient affectées.

- 4.2.1. Éther de pétrole 40-60° C pour chromatographie
- 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, hydraté avec 5% d'eau (m/m)
- 4.2.5. Laine de verre
- 4.2.6. Acétone pour HPLC
- 4.2.7. Acétonitrile pour HPLC
- 4.2.8. Solvant d'élution pour HPLC: acétonitrile + acétone (dont les proportions doivent être ajustées pour obtenir la séparation souhaitée ; commencer avec un mélange 50:50 (v/v)
- 4.2.9. Solvant de solubilisation des échantillons : acétone
- 4.2.10. Triglycérides de référence :
 - soit des triglycérides que l'on trouve dans le commerce (tripalmitine, trioléine, etc.) ; les temps de rétention sont alors reportés sur un graphique conformément au nombre équivalent de carbone,
 - soit des chromatogrammes de référence obtenus à partir d'huile de soja, d'un mélange d'huile de soja et d'huile d'olive 30:70 (v :v) et d'huile d'olive pure (voir notes 1 et 2 et figures 1, 2, 3, 4).

4.3. Préparation des échantillons

Certains composés peuvent provoquer des interférences et donner ainsi des résultats positifs erronés lors de l'analyse par HPLC. De ce fait, l'échantillon doit toujours être purifié selon la méthode IUPAC 2.507, utilisée pour la détermination des composés polaires dans les graisses de friture.

4.3.1. 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, 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'éluion (4.2.3.) ; la transférer ensuite dans la colonne au moyen d'un entonnoir en verre (4.1.6.).

Afin que la totalité du gel de silice soit transférée dans la colonne, laver le bécher avec le mélange d'éluion 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 1 cm au-dessus du gel de silice.

4.3.2. Chromatographie sur colonne

Peser, avec une précision de 0,001g, $2,5 \pm 0,1$ g d'huile, préalablement filtrée, homogénéisée et, si nécessaire, déshydratée, dans un ballon taré de 50 ml (4.1.7.). Diluer dans 20 ml environ de solution d'éluion (4.2.3.). Si nécessaire, chauffer légèrement pour faciliter la dissolution. Refroidir à température ambiante et porter au volume avec du solvant d'éluion.

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'éluion (4.2.3.), en réglant le débit du solvant à un débit de 2 ml/min. environ (de telle sorte que 150 ml soient élués en 60-70 min.).

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

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

4.4. Séparation par HPLC des triglycérides

4.4.1. Préparation de l'échantillon 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 complétée à 10 ml avec le solvant de solubilisation (4.2.9.).

4.4.2. Protocole expérimental

Mettre en marche le système chromatographique. Pomper le solvant d'élution (4.2.8.) à un débit de 1,5 ml/minute de façon à purger l'ensemble du système. Attendre d'avoir une ligne de base stable. Injecter 10 µl de l'échantillon préparé selon le point 4.3.

4.4.3. Calcul et expression des résultats : composition expérimentale en triglycérides

Utiliser la méthode de normalisation interne, c'est-à-dire admettre que la somme des aires des pics correspondant aux triglycérides à ECN compris entre 42 et 52 (inclus) est égale à 100. Calculer le pourcentage relatif de chaque triglycéride selon la formule suivante :

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

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

Voir notes 1, 2, 3 et 4.

4.5. Détermination de la composition théorique des triglycérides (moles %) à partir des données de composition en acides gras (% obtenu par CPG)

4.5.1. Détermination de la composition en acides gras

La composition des acides gras est déterminée selon la méthode ISO 5508 au moyen d'une colonne capillaire. Les esters méthyliques sont préparés selon la méthode ISO 5509 (méthode au méthylate de sodium en solution méthanolique).

4.5.2. Acides gras intervenant dans le calcul de la composition théorique en TG

Les tryglycérides sont regroupés en fonction de leur nombre équivalent de carbone (ECN), compte tenu des relations suivantes entre ECN et acides gras. Seuls les acides gras ayant 16 ou 18 atomes de carbone ont été pris en considération, car ce sont les acides gras majoritaires de l'huile d'olive.

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 pourcentage centésimal de chaque acide gras :

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

4.5.4. Composition en acide gras exprimée en moles % (normalisation interne)

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

$$\text{moles \% L (1,2,3)} = \frac{\text{moles L} * 100}{\text{moles (P +S +Po +O +L +Ln)}}$$

$$\text{moles \% Ln (1,2,3)} = \frac{\text{moles Ln} * 100}{\text{moles (P +S +Po +O +L+Ln)}}$$

Le résultat indique le pourcentage de chaque acide gras exprimé en moles % de l'ensemble des positions (1,2,3-) des TG.

Calculer alors la somme des acides gras saturés P et S (SAG) et des acides gras insaturés Po, O, L et Ln (AGI) :

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

4.5.5. Calcul de la composition des acides gras en positions 2 et 1-3 du glycérol :

Les acides gras sont répartis en trois ensembles de la manière suivante : deux ensembles identiques pour les positions 1 et 3 et un autre ensemble pour la position 2. Des coefficients différents sont attribués aux acides gras saturés (P et S) et aux acides gras insaturés (Po, O, L et Ln).

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

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

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

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

$$\text{moles \% Ln (2)} = \frac{\text{moles \% Ln (1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * (100 - \text{moles \% P (2)} - \text{moles \% S (2)})$$

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)] du glycérol :

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

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

4.5.6. Calcul du pourcentage en moles des différents types de triglycérides

4.5.6.1. TG avec 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 avec 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 avec trois acides gras différents (ABC, ici OLLn, PLLn, PoOLn, PPOLn)

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

4.5.6.4. Composition théorique des triglycérides à ECN 42

Les triglycérides à ECN42 sont calculés selon les équations 7, 8 et 9, et figurent ci-après par ordre d'élution attendu en HPLC (on observe généralement trois pics chromatographiques seulement).

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 PLnPo et PoPLn

La composition théorique des triglycérides à ECN42 s'obtient en calculant la somme des neuf glycérides, y compris leurs isomères de position. Les résultats doivent comporter au moins deux chiffres après la virgule.

5. Évaluation des résultats

Comparer la composition théorique calculée et celle déterminée par HPLC. Si la différence entre les « données HPLC moins les données théoriques » est supérieure à la valeur fixée par la norme en vigueur pour la catégorie d'huile appropriée, l'échantillon contient de l'huile de graines.

Les résultats de la différence sont exprimés avec un chiffre après la virgule.

6. Exemple (La numération se réfère aux sections du texte de la méthode)

- 4.5.1. Calcul des acides gras par le % de moles à partir des données obtenues par CPG (% centésimal)

On obtient les données suivantes pour la composition en acides gras par CPG :

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

- 4.5.3. Conversion du % centésimal en moles pour tous les acides gras

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

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

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

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

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

} voir formule (1)

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

$$\text{Total} = 0,35822 \text{ moles TG}$$

- 4.5.4. Composition en acides gras exprimée en moles % (normalisation interne)

$$\text{moles \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 10,888\%$$

$$\text{moles \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 2,944\%$$

$$\text{moles \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,097\%$$

$$\text{moles \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 74,113\%$$

$$\text{moles \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 9,956\%$$

$$\text{moles \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,003\%$$

} voir formule (2)

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

Somme des acides gras saturés et insaturés dans les positions 1,2 et 3 du glycérol :

$$\begin{aligned} \text{moles \% SAG} &= 10,888\% + 2,944\% = 13,831\% \\ \text{moles \% AGI} &= 100,000\% - 13,831\% = 86,169\% \end{aligned}$$

} voir formule (3)

- 4.5.5. Calcul de la composition en acides gras dans les positions 2 et 1-3 du glycérol

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

$$\begin{aligned} \text{moles \% P(2)} &= 10,888\% * 0,06 = 0,653 \text{ moles \%} \\ \text{moles \% S(2)} &= 2,944\% * 0,06 = 0,177 \text{ moles \%} \end{aligned}$$

} voir formule (4)

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

$$\text{moles \% Po(2)} = \frac{1,097\%}{86,169\%} * (100--0,659-0,177) = 1,263 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% O(2)} = \frac{74,113\%}{86,169\%} * (100--0,659-0,177) = 85,295 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% L(2)} = \frac{9,956\%}{86,169\%} * (100--0,659-0,177) = 11,458 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% Ln(2)} = \frac{1,003\%}{86,169\%} * (100--0,659-0,177) = 1,154 \text{ moles \%}$$

} voir formule (5)

- 4.5.5.3. Acides gras en position 5, 1 et 3 [P(1,3), S(1,3),Po(1,3), O(1,3) L(1,3) et Ln(1,3)]

$$\text{moles \% P(1,3)} = \frac{10,888 - 0,659}{2} + 10,888 = 16,005 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% S(1,3)} = \frac{2,944 - 0,177}{2} + 2,944 = 4,327 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,263}{2} + 1,097 = 1,015 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,295}{2} + 74,113 = 68,522 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} + 9,956 = 9,205 \text{ moles \%}$$

$$\text{moles \% Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} + 1,003 = 0,927 \text{ moles\%}$$

} voir formule (6)

- 4.5.6. Calcul de la composition théorique des triglycérides à ECN 42

À partir de la composition calculée en acides gras dans les positions sn-2 et sn-1,3 :

AG en	position 1,3	position 2
P	16,005%	0,653%
S	4,327%	0,177%
Po	1,015%	1,263%
O	68,522%	85,295%
L	9,205%	11,458%
Ln	0,927%	1,154%
Total	100,0%	100,0%

calculer les triglycérides suivants:

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

- 4.5.6.1 TG avec un acide gras (LLL, PoPoPo)

voir formule (7)

$$\text{moles\% LLL} = \frac{9,205\% * 11,458\% * 9,205\%}{10.000} = \boxed{0,09708 \text{ mol LLL}}$$

$$\text{moles\% PoPoPo} = \frac{1,015\% * 1,263\% * 1,015\%}{10.000} = \boxed{0,00013 \text{ mol PoPoPo}}$$

- 4.5.6.2 TG avec deux acides gras (PoLL, SLnLn, PoPoL)

voir formule (8)

$$\text{moles\%PoLL+LLPo} = \frac{1,015\% * 11,458\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,02141$$

$$\text{moles\%LPoL} = \frac{9,205\% * 1,263\% * 9,205\%}{10.000} = 0,01070$$

0,03211 mol PoLL

$$\text{moles\%SLnLn+LnLnS} = \frac{4,327\% * 1,154\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,00093$$

$$\text{moles\%LnSLn} = \frac{0,927\% * 0,177\% * 0,927\%}{10.000} = 0,00002$$

0,00095 mol SLnLn

$$\text{moles\%PoPoL+LPoPo} = \frac{1,015\% * 1,263\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,00236$$

$$\text{moles\%PoLPo} = \frac{1,015\% * 11,458\% * 1,015\%}{10.000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

- 4.5.6.3 TG avec trois acides gras différents (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) voir formule (9)

$$\text{moles\%PPoLn} = \frac{16,005\% * 1,263\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,00375$$

$$\text{moles\%LnPPo} = \frac{0,927\% * 0,653\% * 1,015\% * 2}{10.000} = 0,00012$$

$$\text{moles\%PoLnP} = \frac{1,015\% * 1,154\% * 16,005\% * 2}{10.000} = 0,00375$$

0,00762 mol PPoLn

$$\text{moles\%OLLn} = \frac{68,522\% * 11,458\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,14577$$

$$\text{moles\%LnOL} = \frac{0,927\% * 85,295\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,14577$$

$$\text{moles\%LLnO} = \frac{9,205\% * 1,154\% * 68,522\% * 2}{10.000} = 0,14577$$

0,43671 mol OLLn

$$\text{moles\%PLLn} = \frac{16,005\% * 11,458\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,03400$$

$$\text{moles\%LnPL} = \frac{0,927\% * 0,653\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,00111$$

$$\text{moles\%LLnP} = \frac{9,205\% * 1,154\% * 16,005\% * 2}{10.000} = 0,03400$$

0,06911 mol PLLn

$$\text{moles\%PoOLn} = \frac{1,015\% * 85,295\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,01605$$

$$\text{moles\%LnPoO} = \frac{0,927\% * 1,263\% * 68,522\% * 2}{10.000} = 0,01605$$

$$\text{moles\%OLnPo} = \frac{68,522\% * 1,154\% * 1,015\% * 2}{10.000} = 0,01605$$

0,04815 mol PoOLn

Composition théorique des TG à ECN42 =

0,69540 mol TG

Note 1 : l'ordre d'élution peut être déterminé en calculant le nombre équivalent de carbone, souvent défini par la relation $ECN = CN - 2n$, dans laquelle CN est le nombre de carbone et n le nombre de doubles liaisons ; il peut être calculé de manière plus précise en tenant compte de l'origine de la double liaison. Si n_o , n_l et n_{ln} sont les nombres de doubles liaisons attribuées respectivement aux acides oléique, linoléique et linoléinique, le nombre équivalent de carbone peut être calculé selon la formule suivante :

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln},$$

dans laquelle les coefficients d_o , d_l et d_{ln} sont calculés à partir des triglycérides de référence. Dans les conditions énoncées dans cette méthode, la relation obtenue est voisine de :

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_l) - (2,17 n_{ln})$$

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

$$\alpha = TR' / TR \text{ de trioléine}$$

en utilisant le temps de rétention réduit TR' du soluté = TR de soluté - TR du solvant.

Le graphique représentant le logarithme α en fonction de f (nombre de doubles liaisons) permet de déterminer les valeurs de rétention pour tous les triglycérides des 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 à prendre en compte dans la présente détermination est garantie si la hauteur du deuxième pic correspondant à ECN 50 est égale à 50 % du maximum de l'échelle.

Figure 1: Évolution du $\log \alpha$ en fonction de f (numero de liaisons doubles)

Nombre de doubles liaisons

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

Figure 2: Huile de soja

Figure 3: Huile de soja / huile d'olive 30:70

Figure 4: Huile d'olive

MARGES DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE

1. Analyse des résultats de l'essai collaboratif

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 Conseil Oléicole International 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 Conseil Oléicole International 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 fait état des informations suivantes :

n	Nombre de laboratoires ayant pris part à l'essai
outliers	Nombre de laboratoires aux résultats aberrants
mean	Moyenne des résultats acceptés
r	Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95 % , la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus en appliquant la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans le même laboratoire avec le même opérateur utilisant le même appareillage et pendant un court intervalle de temps
S_r	Écart-type de répétabilité
RSD_r (%)	Coefficient de variation de répétabilité ($S_r \times 100 / \text{mean}$)
R	Valeur sous laquelle est située, avec une probabilité de 95 % , la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels obtenus en appliquant la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans des laboratoires différents, avec des opérateurs différents utilisant un appareillage différent

S_R Écart-type de reproductibilité

RSD_R (%) Coefficient de variation de reproductibilité ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Marges de précision 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	0.041
RSD_r (%)	82.24 _(not sig.)	2.77	76.11 _(not sig.)	22.51	5.07
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(%)	127.56 _(not sig.)	5.42	132.17 _(not sig.)	46.19	10.85

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