



## **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 et les résultats expérimentaux des triglycérides (TG), en terme d'indice d'équivalent carbone 42 ( $ECN_{42}^{HPLC}$ ), obtenus par analyse directe de l'huile par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC), et la composition théorique des TG, en terme d'indice d'équivalent carbone 42 ( $ECN_{42}^{théorique}$ ), calculée à partir de la composition en acides gras.

#### **2. Domaine 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 Béchers 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 : réfractomètre différentiel. La sensibilité pleine échelle doit atteindre au moins  $10^4$  unités d'indice de réfraction
- 4.1.13 Colonne : tube 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 Logiciel de traitement des données.
- 4.1.15 Fioles d'environ 2 ml avec bouchons à vis garnis de téflon.

\*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 ou 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, hydraté avec 5 % d'eau (m/m)

- 4.2.5. Laine de verre
- 4.2.6. Acétone pour HPLC
- 4.2.7. Acétonitrile ou propionitrile pour HPLC
- 4.2.8. Solvant d'éluion pour HPLC: acétonitrile + acétone (dont les proportions doivent être ajustées pour obtenir la séparation souhaitée ; commencer avec un mélange 50:50 (v/v) ou propionitrile
- 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).
- 4.2.11. Colonne d'extraction en phase solide avec phase de silice 1g, 6 ml.

### **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'éluion (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'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 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 dans un évaporateur rotatif (4.1.9.) 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.

### **4.3.3. Purification de la SPE**

La colonne SPE de silice est activée par le passage de 6 ml d'hexane (4.2.3.) sous vide, en évitant le séchage. Peser  $0,12 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$  dans 0,5 ml d'hexane (4.2.3.).

Remplir la colonne SPE avec la solution et éluer avec 10 ml d'hexane-diéthylether (87:13 v/v) (4.2.3.) sous vide.

Les éluations combinées sont homogénéisées et évaporées jusqu'à leur séchage dans un évaporateur rotatif (4.1.9.) sous pression réduite à température ambiante. Diluer le résidu dans 2 ml d'acétone (4.2.6.) pour l'analyse des triglycérides (TG).

#### **4.4. Analyse HPLC**

##### **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'éluion (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**

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 triglycerides (moles %) à partir des données de composition en acides gras (aire %)**

##### **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 COI/T.20/Doc. n° 24.

#### 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. Les acides gras devront 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 pourcentage centésimal de chaque acide gras :

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

#### 4.5.4. Normalisation des acides gras exprimés en moles à 100 %

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

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 :

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

**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)] du glycérol :**

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

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

**4.5.6. Calcul des triglycérides**

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

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

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

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

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

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

**4.5.6.4. Triglycérides à ECN 42**

Les triglycérides à ECN42 sont calculés selon les équations 7, 8 et 9, et figurent ci-après par ordre d'éluion 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 en valeur absolue 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 deux chiffres après la virgule.

**6. Exemple** (la numération se réfère aux sections du texte de la méthode)**- 4.5.1. Calcul des acides gras exprimés en % de moles à partir des données obtenues par CPG (% centésimal normalisé)**

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**

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

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

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

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

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

$$\text{moles Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ moles Ln}$$

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

voir formule (1)

**- 4.5.4. Normalisation des acides gras exprimés en moles à 100 %**

$$\text{moles \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 10,887\%$$

$$\text{moles \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 2,942\%$$

$$\text{moles \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,097\%$$

$$\text{moles \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 74,116\%$$

$$\text{moles \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 9,955\%$$

$$\text{moles \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35821 \text{ moles}} = 1,002\%$$

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

} voir formule (2)

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

$$\begin{aligned} \text{moles \% SAG} &= 10,887\% + 2,942\% = 13,829\% \\ \text{moles \% AGI} &= 100,000\% - 13,829\% = 86,171\% \end{aligned}$$

} 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)]**

$$\begin{aligned} \text{moles \% P(2)} &= 10,887\% * 0,06 = 0,653 \text{ moles \%} \\ \text{moles \% S(2)} &= 2,942\% * 0,06 = 0,177 \text{ moles \%} \end{aligned}$$

} voir formule (4)

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

$$\begin{aligned}
 \text{moles \% Po(2)} &= \frac{1,097\%}{86,171\%} * (100-0,653-0,177) = 1,262 \text{ moles \%} \\
 \text{moles \% O(2)} &= \frac{74,116\%}{86,171\%} * (100-0,653-0,177) = 85,296 \text{ moles \%} \\
 \text{moles \% L(2)} &= \frac{9,955\%}{86,171\%} * (100-0,653-0,177) = 11,457 \text{ moles \%} \\
 \text{moles \% Ln(2)} &= \frac{1,002\%}{86,171\%} * (100-0,653-0,177) = 1,153 \text{ moles \%}
 \end{aligned}$$

} 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)]**

$$\begin{aligned}
 \text{moles \% P(1,3)} &= \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \text{ moles \%} \\
 \text{moles \% S(1,3)} &= \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \text{ moles \%} \\
 \text{moles \% Po(1,3)} &= \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \text{ moles \%} \\
 \text{moles \% O(1,3)} &= \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \text{ moles \%} \\
 \text{moles \% L(1,3)} &= \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \text{ moles \%} \\
 \text{moles \% Ln(1,3)} &= \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \text{ moles \%}
 \end{aligned}$$

} voir formule (6)

#### - 4.5.6. Calcul des triglycérides

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	16,004%	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%

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)

$$\text{moles\% LLL} = \frac{9,204\% * 11,457\% * 9,204\%}{10.000} = \mathbf{0,09706 \text{ mol LLL}}$$

$$\text{moles\% PoPoPo} = \frac{1,015\% * 1,262\% * 1,015\%}{10.000} = \mathbf{0,00013 \text{ mol PoPoPo}}$$

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

voir formule (8)

$$\text{moles\%PoLL+LLPo} = \frac{1,015\% * 11,457\% * 9,204\% * 2}{10.000} = 0,02141$$

$$\text{moles\%LPoL} = \frac{9,204\% * 1,262\% * 9,204\%}{10.000} = 0,01069$$

**0,03210 mol PoLL**

$$\text{moles\%SLnLn+LnLnS} = \frac{4,325\% * 1,153\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,00092$$

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

**0,00094 mol SLnLn**

$$\text{moles\%PoPoL+LPoPo} = \frac{1,015\% * 1,262\% * 9,204\% * 2}{10.000} = 0,00236$$

$$\text{moles\%PoLPo} = \frac{1,015\% * 11,457\% * 1,015\%}{10.000} = 0,00118$$

**0,00354mol PoPoL**

**- 4.5.6.3 TG avec trois acides gras différents (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)**

voir formule (9)

$$\text{moles\%PPoLn} = \frac{16,004\% * 1,262\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,00374$$

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

$$\text{moles\%PoLnP} = \frac{1,015\% * 1,153\% * 16,004\% * 2}{10.000} = 0,00375$$

**0,00761 mol PPLn**

$$\text{moles\% OLLn} = \frac{68,526\% * 11,457\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,14556$$

$$\text{moles\% LnOL} = \frac{0,927\% * 85,296\% * 9,204\% * 2}{10.000} = 0,14555$$

$$\text{moles\% LLnO} = \frac{9,204\% * 1,153\% * 68,526\% * 2}{10.000} = 0,14544$$

**0,43655 mol OLLn**

$$\text{moles\% PLLn} = \frac{16,004\% * 11,457\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,03399$$

$$\text{moles\% LnPL} = \frac{0,927\% * 0,653\% * 9,204\% * 2}{10.000} = 0,00111$$

$$\text{moles\% LLnP} = \frac{9,204\% * 1,153\% * 16,004\% * 2}{10.000} = 0,03397$$

**0,06907 mol PLLn**

$$\text{moles\% PoOLn} = \frac{1,015\% * 85,296\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,01605$$

$$\text{moles\% LnPoO} = \frac{0,927\% * 1,262\% * 68,526\% * 2}{10.000} = 0,01603$$

$$\text{moles\% OLnPo} = \frac{68,526\% * 1,153\% * 1,015\% * 2}{10.000} = 0,01604$$

**0,04812 mol PoOLn**

Composition théorique des TG à ECN42 = **0,69512 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 linoléique, 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 :

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

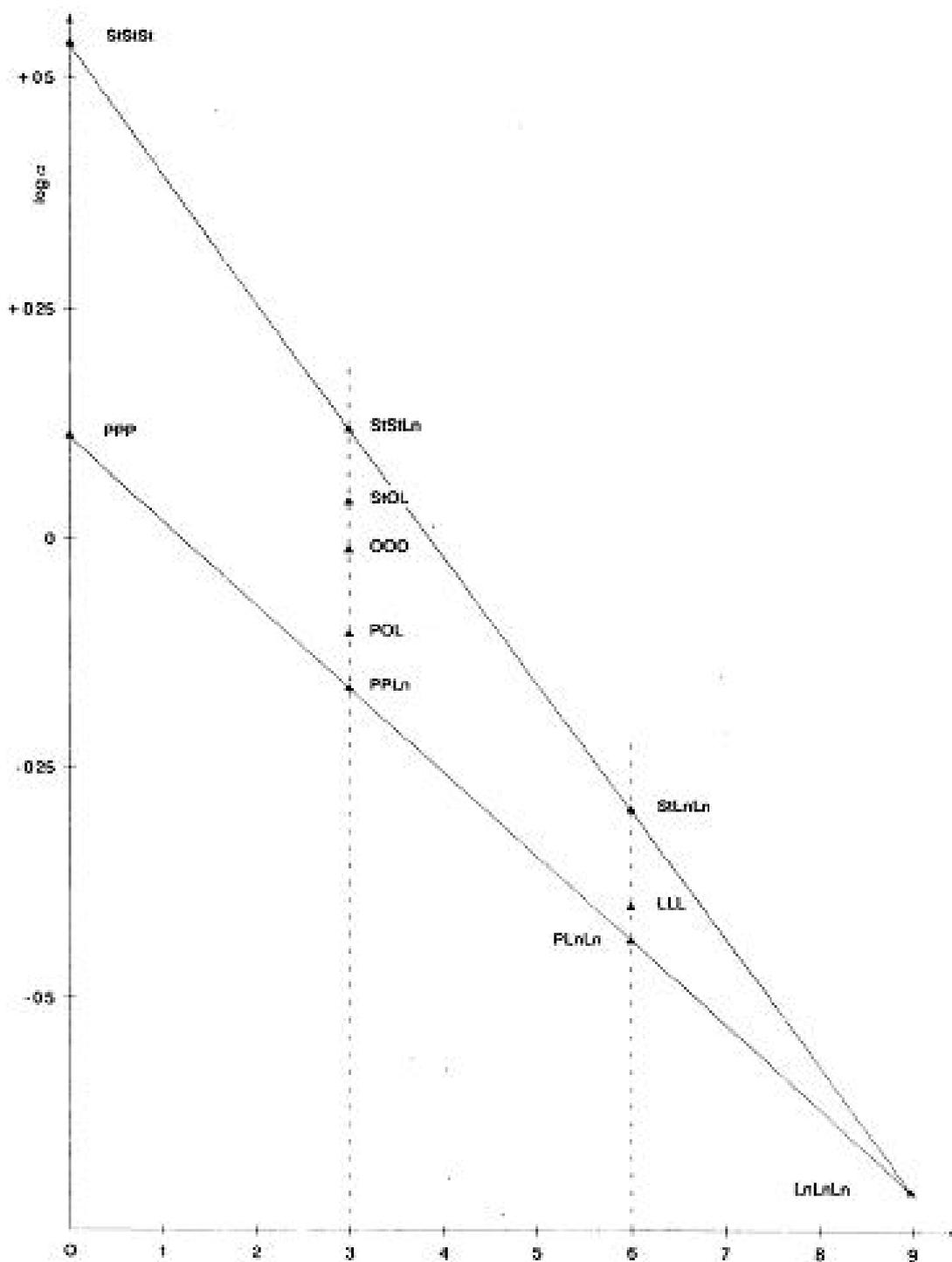
en utilisant le temps de rétention réduit  $TR'$  du soluté =  $TR$  de soluté -  $TR$  du solvant.

Le graphique représentant le logarithme  $\alpha$  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** : Les aires de tous les pics d'intérêt pour la présente analyse sont mesurées correctement si le deuxième pic correspondant à l'ECN 50 est de 50 % de l'échelle.

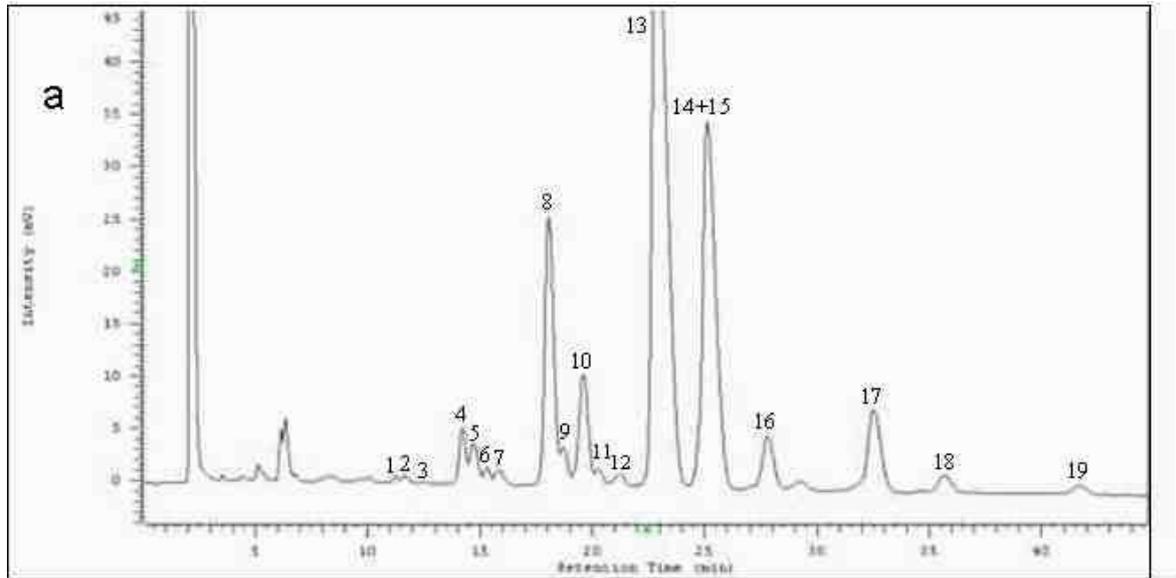
Figure 1: Évolution du log  $\alpha$  en fonction de f (nombre de doubles liaisons)



Nombre de doubles liaisons

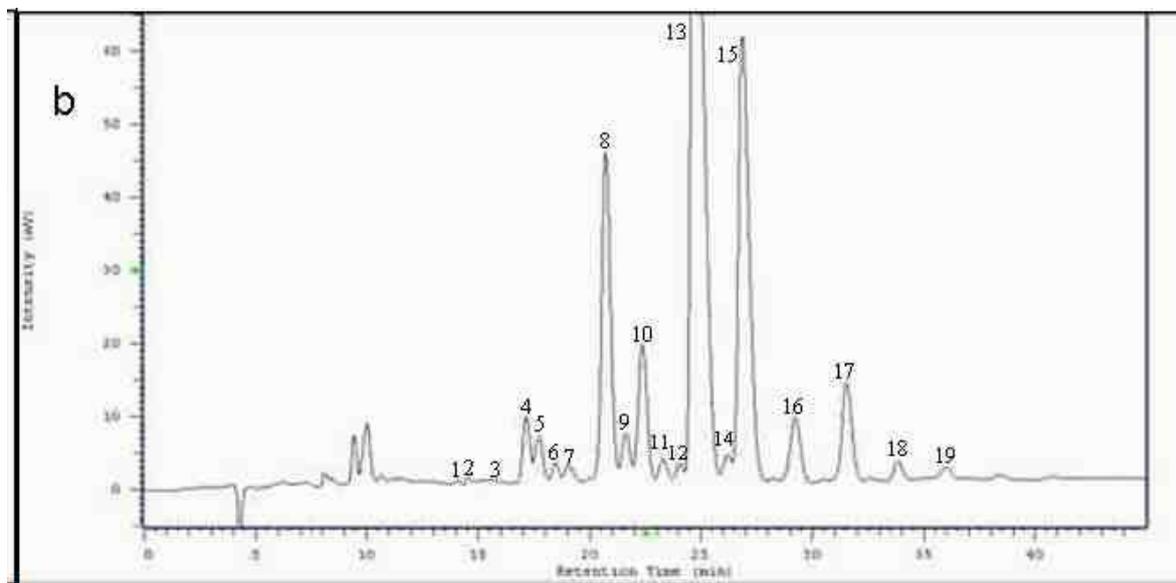
Note: La: acide laurique; My: acide myristique; P: acide palmitique; St: acide stéarique;  
O: acide oléique; L: acide linoléique; Ln: acide linoléique.

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



Avec Acétone/Acétonitrile.

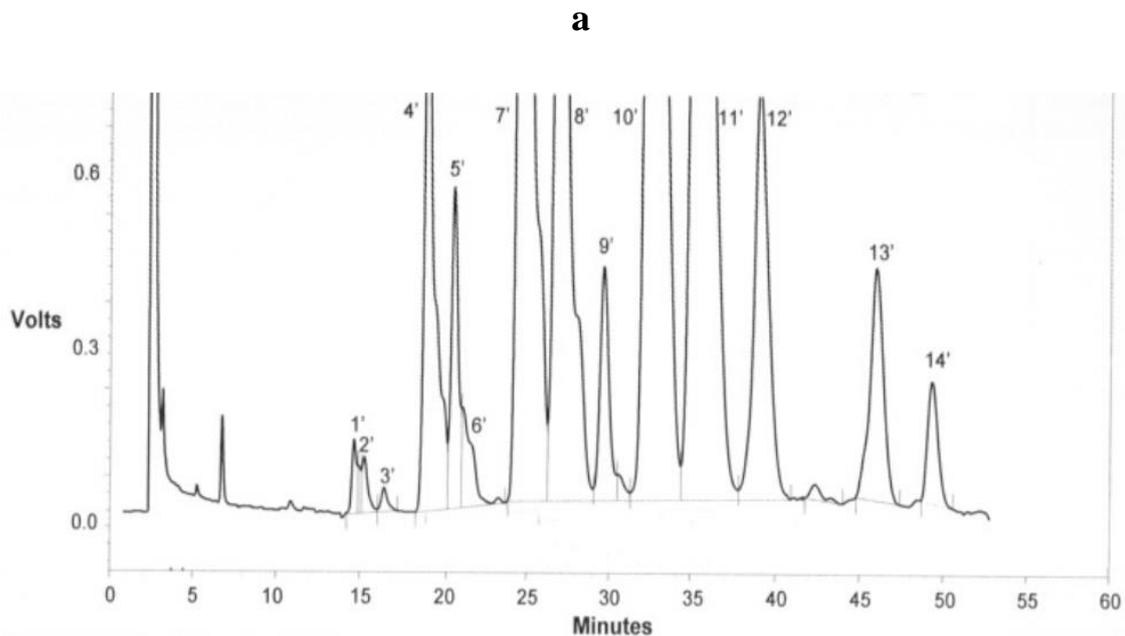
PROFIL a : Principaux composants des pics chromatographiques : **ECN42**: (1) LLL+PoLL; (2) OLLn+PoOLn; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL+PoOL; (5) OOLn +PLL; (6) POLn+PPoPo; (7) OOL+PoOO; **ECN46**: (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO+PoPP; (14+15)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



Avec : Propionitrile

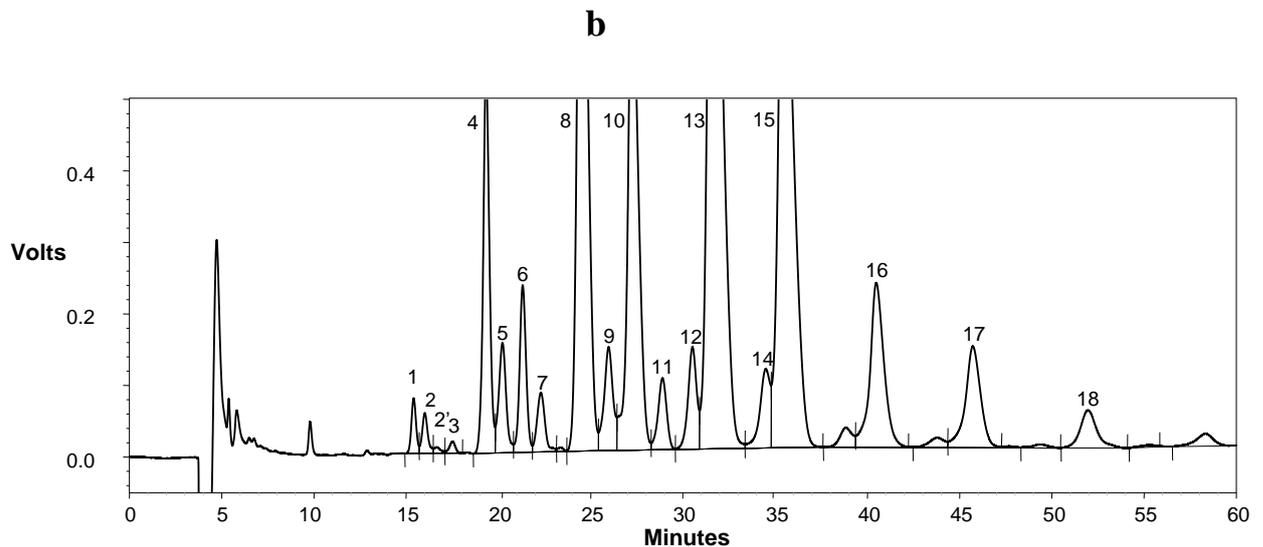
PROFIL b : Principaux composants des pics chromatographiques : **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn+PoOL; (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; **ECN46**: (8) OOL+LnPP; (9) PoOO; (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO+PoPP; (14) SOL;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

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



Avec Acétone/Acétonitrile (50:50).

PROFIL 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



Avec : Propionitrile

PROFIL 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

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 :

<b>n</b>	Nombre de laboratoires ayant pris part à l'essai
<b>outliers</b>	Nombre de laboratoires aux résultats aberrants
<b>mean</b>	Moyenne des résultats acceptés
<b>r</b>	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
<b>S<sub>r</sub></b>	Écart-type de répétabilité
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	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<sub>R</sub>** Écart-type de reproductibilité
- RSD<sub>R</sub> (%)** Coefficient de variation de reproductibilité ( $S_R \times 100 / \text{mean}$ )

### Différence entre la composition réelle et théorique des triglycérides à ECN 42

	A	B	C	D	E
<b>n</b>	19	19	19	19	19
<b>outliers</b>	1	0	0	0	3
<b>mean</b>	0.04	1.66	0.04	0.18	0.82
<b>r</b>	0.08	0.12	0.09	0.11	0.11
<b>S<sub>r</sub></b>	0.02	0.04	0.03	0.04	0.041
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	82.24 <sub>(non sig.)</sub>	2.77	76.11 <sub>(non sig.)</sub>	22.51	5.07
<b>R</b>	0.12	0.25	0.16	0.22	0.24
<b>S<sub>R</sub></b>	0.05	0.09	0.05	0.08	0.08
<b>RSD<sub>R</sub>(%)</b>	127.56 <sub>(non sig.)</sub>	5.42	132.17 <sub>(non sig.)</sub>	46.19	10.85

### Validation des données du $\Delta$ ECN42 calculé à partir de l'ECN42 expérimental déterminé avec le propionitrile.

L'analyse a été effectuée sur quatre échantillons :

- 035-07 : 70 % d'huile d'olive vierge + 10 % d'huile de grignons d'olive raffinée + 20 % d'huile de tournesol riche en acide oléique ;
- 036-07 : 80 % d'huile d'olive vierge riche en campesterol + 20 % d'huile de palme ;
- 038-08 : 100 % d'huile d'olive vierge
- 039-08 : 70 % d'huile d'olive vierge + 15 % d'huile de grignons d'olive raffinée + 15 % d'huile de tournesol riche en acide oléique

### **Différence entre la teneur réelle et la teneur théorique en triglycérides à ECN 42**

	035-07	036-07	038-08	039-08
<b>n</b>	16	16	11	11
<b>outliers</b>	0	2	0	0
<b>mean</b>	1.07	0.10	0.06	0.84
<b>r</b>	0.05	0.02	0.06	0.06
<b>Sr</b>	0.02	0.01	0.023	0.02
<b>RSDr (%)</b>	1.57	7.93	36.60	2.69
<b>R</b>	0.33	0.11	0.12	0.35
<b>Sr</b>	0.12	0.04	0.04	0.12
<b>RSDr(%)</b>	11.21	36.80	78.58 <sub>(not sig.)</sub>	14.77

## **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**