



## **MÉTHODE D'ÉVALUATION DE LA COHÉRENCE ENTRE LA COMPOSITION EN TAG ET LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS**

### **1. OBJET**

La méthode est utilisée pour vérifier la cohérence entre la composition en triacylgcérols des huiles d'olive et leur composition en acides gras. La composition théorique en triacylgcérols calculée à partir de la composition en acides gras est similaire dans l'huile d'olive à la composition expérimentale en triacylgcérols. La méthode indique seulement si la composition en triacylgcérols de l'huile d'olive est cohérente ou non cohérente.

### **2. PRINCIPE**

La composition expérimentale en triacylgcérols (TAG) est comparée à la composition théorique obtenue à partir de l'analyse des esters méthyliques d'acides gras (FAME). L'huile est purifiée par extraction en phase solide (SPE) sur des cartouches de gel de silice. La composition en TAG est déterminée par chromatographie liquide à haute résolution en phase inverse (RP-HPLC) au moyen d'un détecteur d'indice de réfraction et du propionitrile comme phase mobile. Les FAME sont préparés à partir d'une huile purifiée par méthylation à froid dans une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium puis les esters sont analysés par chromatographie gazeuse capillaire au moyen d'une colonne de polarité élevée (COI/T.20/Doc. n° 33 rev. 1). La composition théorique en TAG est calculée à partir de la composition en acides gras au moyen d'un logiciel informatique basé sur une distribution aléatoire 1, 3, 2 des acides gras dans le triacylgcérol, avec des restrictions pour les acides gras saturés en position 2. La méthode de calcul est une modification de la procédure décrite dans le document COI/T.20/Doc. n° 20. Des algorithmes mathématiques sont calculés à partir de compositions théoriques et expérimentales en TAG et les valeurs obtenues sont comparées à celles d'une base de données élaborée à partir d'huiles d'olive authentiques.

### **3. MATÉRIEL ET RÉACTIFS**

#### **3.1. Purification de l'huile**

- 3.1.1. Fioles coniques de 25 ml de capacité.
- 3.1.2. Éprouvettes de 5 ml de capacité à bouchon vissant muni d'un joint en PTFE.
- 3.1.3. Cartouches de gel de silice, 1 g (6 ml), pour extraction en phase solide.
- 3.1.4. n-Hexane de qualité analytique.
- 3.1.5. Éther diéthylique de qualité analytique.
- 3.1.6. Mélange de solvant hexane/éther diéthylique (87:13, v/v).
- 3.1.7. n-Heptane de qualité analytique.
- 3.1.8. Acétone de qualité analytique.

#### **3.2. Analyse des triacylglycérols par HPLC**

- 3.2.1. Microseringues (50 µL) et aiguilles pour injection dans la colonne HPLC
- 3.2.2. Propionitrile, de haute pureté ou pour HPLC, comme phase mobile.
- 3.2.3. Colonne HPLC (25 cm x 4 mm i.d.), avec phase RP-18 (4µm taille particule).

#### **3.3. Préparation des esters méthyliques des acides gras (voir méthode pour la détermination des esters méthyliques des acides gras par chromatographie gazeuse COI/T.20/Doc. n° 33 rev. 1).**

- 3.3.1. Méthanol ne contenant pas plus de 0,5% d'eau.
- 3.3.2. n-Heptane de qualité analytique.
- 3.3.3. Solution d'hydroxyde de potassium : solution méthanolique de 2N : Dissoudre 1,1 g d'hydroxyde de potassium dans 10 ml de méthanol.
- 3.3.4. Éprouvettes de 5 ml de capacité à bouchon vissant muni d'un joint de PTFE.

#### **3.4. Analyse des FAME par CG (voir méthode de détermination des esters méthyliques des acides gras par chromatographie gazeuse COI/T.20/Doc. n° 33 rev. 1).**

- 3.4.1. Microseringues (5 µL) pour chromatographie en phase gazeuse, avec aiguilles.
- 3.4.2. Gaz vecteur : hydrogène ou hélium.
- 3.4.3. Hydrogène et air pour détecteur FID.
- 3.4.4. Gaz auxiliaire : nitrogène ou hélium.
- 3.4.5. Colonne capillaire en silice fondue (50-60 m x 0,25-0,30 mm de diamètre intérieur) recouverte de liquide cyanopropylpolysiloxane ou cyanopropylphenylsiloxane (SP-2380 ou équivalent) avec épaisseur de 0,20 à 0,25 µm.

### **4. MATÉRIEL**

#### **4.1. Appareil d'élution à vide pour extraction en phase solide.**

#### **4.2. Évaporateur rotatif.**

#### **4.3. Appareil de HPLC composé de :**

- 4.3.1. Module pour le dégazage de la phase mobile.
- 4.3.2. Vanne d'injection Rheodyne ou injecteur automatique à boucle de 10 µL.
- 4.3.3. Pompe à haute pression.
- 4.3.4. Four thermostat pour colonne HPLC permettant de maintenir la température ambiante (15-20 °C) (type Peltier par exemple).
- 4.3.5. Détecteur d'indice de réfraction.
- 4.3.6. Système informatisé d'acquisition des données muni d'un intégrateur.

**4.4. Appareil de chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire tel que décrit dans COI/T.20/Doc. n° 33, équipé de :**

- 4.4.1.** Injecteur.
- 4.4.2.** Détecteur à ionisation de flamme (FID).
- 4.4.3.** Four avec température programmable.
- 4.4.4.** Système informatisé d'acquisition des données muni d'un intégrateur.

**4.5. Ordinateur équipé du logiciel Microsoft EXCEL.**

**5. Exécution de l'analyse**

**5.1. Purification de l'huile**

Placer une cartouche de silice SPE (3.1.3) dans un appareil d'élution à vide (4.1) et laver sous vide avec 6 ml d'hexane (3.1.4). Cesser d'appliquer le vide pour éviter que la colonne ne sèche et placer une fiole conique (3.1.1) sous la cartouche. Introduire une solution d'huile (environ 0,12 g) dans 0,5 ml d'hexane (3.1.4) dans la colonne. Introduire la solution puis éluer avec 10 ml du solvant (3.1.6) d'hexane-éther diéthylique (87:13 v/v) sous vide. Homogénéiser l'éluat et verser environ la moitié du volume dans une autre fiole conique (3.1.1). Faire évaporer les deux volumes séparément jusqu'à dessiccation dans un évaporateur rotatif (4.2) sous pression réduite et à température ambiante. Pour l'analyse des triacylglycérols, dissoudre l'un des résidus dans 1 ml d'acétone (3.1.8) (voir premier paragraphe de 5.2) et le verser dans une éprouvette de 5 ml à bouchon vissant. Dissoudre l'autre résidu dans 1 ml de n-heptane (3.1.7) et le verser dans une deuxième éprouvette de 5 ml à bouchon vissant pour préparer les esters méthyliques des acides gras.

Note : La purification de l'huile peut être réalisée sur une colonne de gel de silice, comme décrit dans la méthode IUPAC 2.507.

**5.2. Analyse des triacylglycérols par HPLC**

Régler le chromatogramme en maintenant la température de la colonne à 20°C et en utilisant du propionitrile (3.2.2) comme phase mobile à un débit de 0,6 ml/min. Lorsque la ligne de base est stable, effectuer une injection de solvant ; si la ligne de base présente une dérive dans la région de 12 à 25 min, utiliser un autre type d'acétone ou un mélange de propionitrile/acétone (25:75) pour dissoudre l'échantillon.

Note : Certains types d'acétone produisent des dérives de la ligne de base dans la région mentionnée ci-dessus.

Injecter 10 µl de la solution d'huile purifiée dans l'acétone (5%). Le processus dure environ 60 min. La température du four et/ou le débit doivent être ajustés de manière à obtenir un chromatogramme similaire à celui montré dans la Figure 1 où la trilinoléine (pic 1) élue à 15,5 min et jusqu'à ce que les résolutions entre les paires LLL/OLLn (pics 1 et 2) et OLL/OOLn (pics 4 et 5) soient bonnes.

La hauteur du pic 2 (OLLn+PoLL) doit atteindre au moins 3% du fond de l'échelle.

### 5.3. Préparation des esters méthyliques des acides gras.

Ajouter 0,1 mL de la solution méthanolique 2N d'hydroxyde de potassium dans la solution d'huile purifiée dans 1 mL de n-heptane. Boucher l'éprouvette à l'aide du bouchon et bien fermer. Agiter énergiquement pendant 15 secondes et laisser reposer jusqu'à ce que la partie supérieure devienne claire (5 minutes). La solution de n-heptane est prête pour l'injection dans le chromatographe. Il n'est pas recommandé de stocker la solution à température ambiante pendant plus de 12 heures.

### 5.4. Analyse des esters méthyliques des acides gras par chromatographie en phase gazeuse

Suivre la procédure décrite dans la méthode de détermination des acides gras trans insaturés (COI/T.20/Doc. n° 33).

Le chromatographe est porté à une température de 165 °C.

Début isotherme à 165 °C pendant 10 min, puis porter à 200 °C à 1,5 °C/min.

Température de l'injecteur entre 220 °C et 250 °C recommandée pour minimiser la formation des acides gras trans (voir méthode COI).

Température du détecteur : 250 °C.

Pression de la tête de colonne du gaz vecteur hydrogène ou hélium d'environ 130 kPa. Quantité de substance injectée 1 µL en mode split.

On doit obtenir un profil de CG similaire à celui montré dans la Figure 2. On accordera une attention particulière à la résolution entre C18:3 et C20:1 (le pic C18:3 doit apparaître avant le C20:1). Pour atteindre ces conditions, la température initiale et/ou la pression de la tête de la colonne doivent être optimisées. Ajuster les conditions de l'injecteur (température, split ratio et injection) de manière à minimiser la discrimination de l'acide palmitique et palmitoléique.

La hauteur du pic C20:0 doit être d'environ 20% du fond de l'échelle pour quantifier les isomères trans. Si le pic C18:0 présente une distorsion, le volume de l'échantillon devra être réduit.

## 5. IDENTIFICATION DES PICS

### 5.1. Chromatogramme HPLC

La Figure 1 montre un chromatogramme HPLC des triacylglycérols d'une huile d'olive purifiée. Tracer trois lignes de base : le premier entre le début du pic 1 et la fin du pic 3 ; le deuxième entre le début du pic 4 et la fin du pic 8 ; le troisième entre le creux précédant le pic 8 et la fin du pic 18.

L'aire totale est la somme des aires de tous les pics (identifiés et non identifiés), du pic 1 au pic 18. Le pourcentage de chaque pic est donné par

$$\text{TAG}_x (\%) = 100 (A_x / AT)$$

Les pourcentages doivent être indiqués avec deux décimales.

### 5.2. Chromatogramme GC

La Figure 2 montre un chromatogramme GC des esters alkyles des acides gras d'une huile d'olive purifiée. Les pourcentages des acides gras suivants doivent être calculés :

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Palmitique :               | (C16:0) = ester méthylique + ester éthylique  |
| Stéarique :                | (C18:0) = ester méthylique  |
| Palmitoléique :            | Po (C16:1) = somme des esters méthyliques des deux cis-isomères                                   |
| Oléique :                  | O (C18:1) = somme des esters méthyliques des deux cis-isomères + ester éthylique + trans-isomères |
| Linoléique :               | L (C18:2) = ester méthylique + ester éthyliques + trans-isomères                                  |
| Linoléinique :             | Ln (C18:3) = ester méthylique + trans-isomères  |
| Arachidique :              | A (C20:0) = ester méthylique  |
| Eicoséioïque (gondoïque) : | G (C20:1) = ester méthylique  |

Les esters éthyliques et trans-isomères peuvent être absents dans le chromatogramme CG.

L'aire totale (AT) est la somme de tous les pics qui apparaissent dans le chromatogramme, de C14:0 à C24:0, à l'exception de celui correspondant au squalène. Le pourcentage de chaque pic est calculé comme suit :

$$FAx (\%) = 100 (Ax / AT)$$

Les résultats doivent être exprimés avec deux décimales.

Pour les calculs des logiciels, la normalisation en base 100 n'est pas nécessaire. Le logiciel le fait automatiquement.

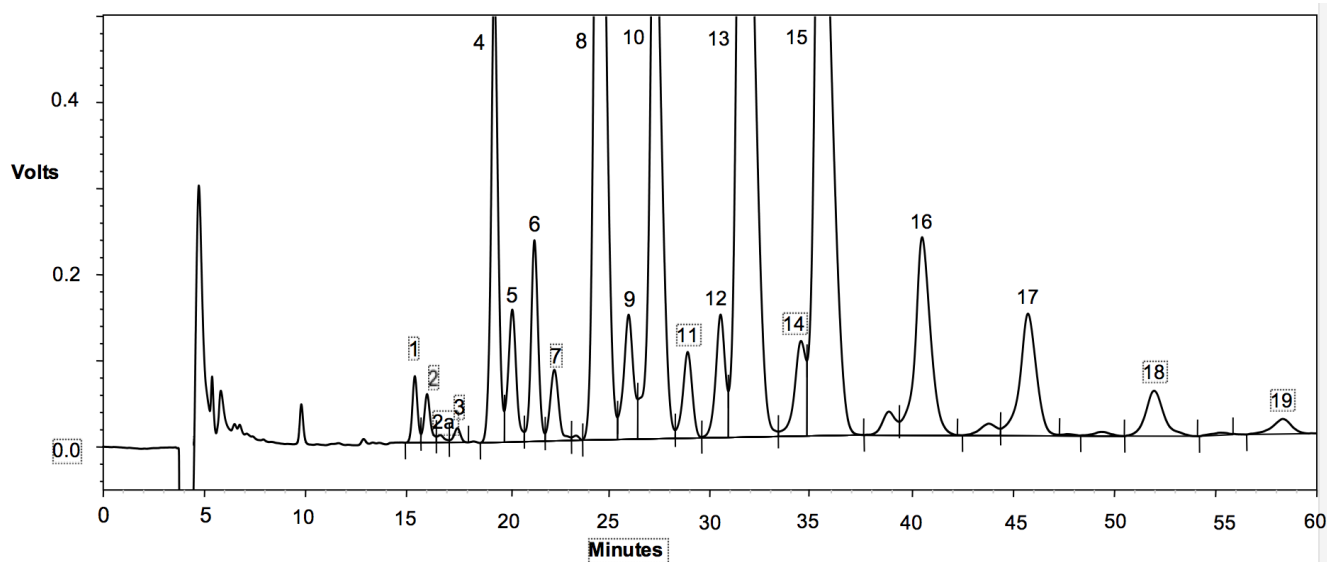


Figure 1. Chromatogramme HPLC des TAG d'une huile d'olive vierge "Chamlali". Principaux composants des pics chromatographiques : (1) LLL ; (2) OLLn+PoLL ; (3) PLLn ; (4) OLL ; (5) OOLn+PoOL ; (6) PLL+PoPoO ; (7) POLn+PPoPo+PPoL ; (8) OOL+LnPP ; (9) PoOO ; (10) SLL+PLO ; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo ; (12) PLP ; (13) OOO+PoPP ; (14) SOL ; (15) POO ; (16) POP ; (17) SOO ; (18) POS+SLS ; (19) AOO.

**Tableau 1 :** Données de répétabilité de la détermination des TAG de l'huile d'olive vierge par HPLC avec colonne à 20° C et propionitrile comme phase mobile.

| ECN | HPLC<br>Pics | TAG                              | Échantillon 1 |          | Échantillon 2 |          | Échantillon 3 |          | Échantillon 4 |          | Échantillon 5 |          |
|-----|--------------|----------------------------------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|
|     |              |                                  | Moyenne(%)    | RSDr (%) | Moyenne(%)    | RSDr (%) | Moyenne(%)    | RSDr (%) | Moyenne(%)    | RSDr (%) | Moyenne(%)    | RSDr (%) |
| 42  | 1            | LLL                              | 0.020         | 7.23     | 0.066         | 5.18     | 0.095         | 4.10     | 0.113         | 0.95     | 0.34          | 1.05     |
|     | 2            | OLLn+<br>PoLL                    | 0.085         | 7.44     | 0.24          | 1.78     | 0.26          | 2.25     | 0.35          | 2.02     | 0.50          | 2.83     |
|     | 3            | PLLn                             | 0.023         | 15.74    | 0.039         | 5.51     | 0.057         | 5.62     | 0.082         | 4.35     | 0.12          | 6.15     |
| 44  | 4            | OLL                              | 0.47          | 1.52     | 1.53          | 0.42     | 2.62          | 0.98     | 3.35          | 1.05     | 4.37          | 1.13     |
|     | 5            | OOLn+<br>PoOL                    | 1.07          | 2.01     | 1.54          | 0.46     | 1.61          | 0.71     | 1.72          | 1.07     | 1.77          | 2.40     |
|     | 6            | PLL+<br>PoPoO                    | 0.11          | 12.86    | 0.24          | 4.37     | 0.65          | 1.32     | 1.35          | 0.73     | 2.28          | 1.24     |
|     | 7            | POLn+<br>PpoPo+<br>PpoL          | 0.42          | 5.11     | 0.49          | 2.89     | 0.55          | 2.01     | 0.85          | 1.83     | 1.09          | 1.96     |
| 46  | 8            | OOL+<br>LnPP                     | 6.72          | 0.63     | 8.79          | 0.31     | 11.21         | 0.42     | 13.25         | 0.33     | 15.24         | 0.23     |
|     | 9            | PoOO                             | 1.24          | 2.86     | 1.49          | 0.95     | 1.63          | 0.85     | 2.12          | 0.45     | 2.52          | 0.56     |
|     | 10           | SLL+<br>PLO                      | 2.70          | 0.65     | 4.05          | 0.70     | 6.02          | 0.65     | 9.86          | 0.53     | 11.53         | 0.31     |
|     | 11           | PoOP+<br>SpoL+<br>SOLn+<br>SpoPo | 0.64          | 4.42     | 0.69          | 3.02     | 0.79          | 1.23     | 1.53          | 0.89     | 1.70          | 1.66     |
| 48  | 12+13        | OOO+<br>PLP+<br>PoPP             | 49.60         | 0.07     | 48.15         | 0.06     | 42.93         | 0.06     | 33.25         | 0.10     | 24.16         | 0.06     |
|     | 14           | SOL                              | 0.82          | 1.72     | 0.92          | 1.56     | 1.05          | 1.32     | 1.25          | 1.05     | 1.60          | 1.77     |
|     | 15           | POO                              | 22.75         | 0.25     | 21.80         | 0.20     | 21.05         | 0.30     | 20.36         | 0.35     | 20.17         | 0.14     |
| 50  | 16           | POP                              | 3.05          | 0.46     | 4.56          | 0.42     | 4.98          | 0.52     | 5.26          | 0.41     | 5.57          | 0.38     |
|     | 17           | SOO                              | 6.87          | 0.21     | 5.56          | 0.33     | 4.86          | 0.43     | 4.12          | 0.72     | 3.09          | 0.69     |
|     | 18           | POS+<br>SLS                      | 1.73          | 1.23     | 1.65          | 1.10     | 1.54          | 0.99     | 1.49          | 1.10     | 1.41          | 1.00     |

n = 3 réplicats

RSDr = Écart type relatif de la répétabilité

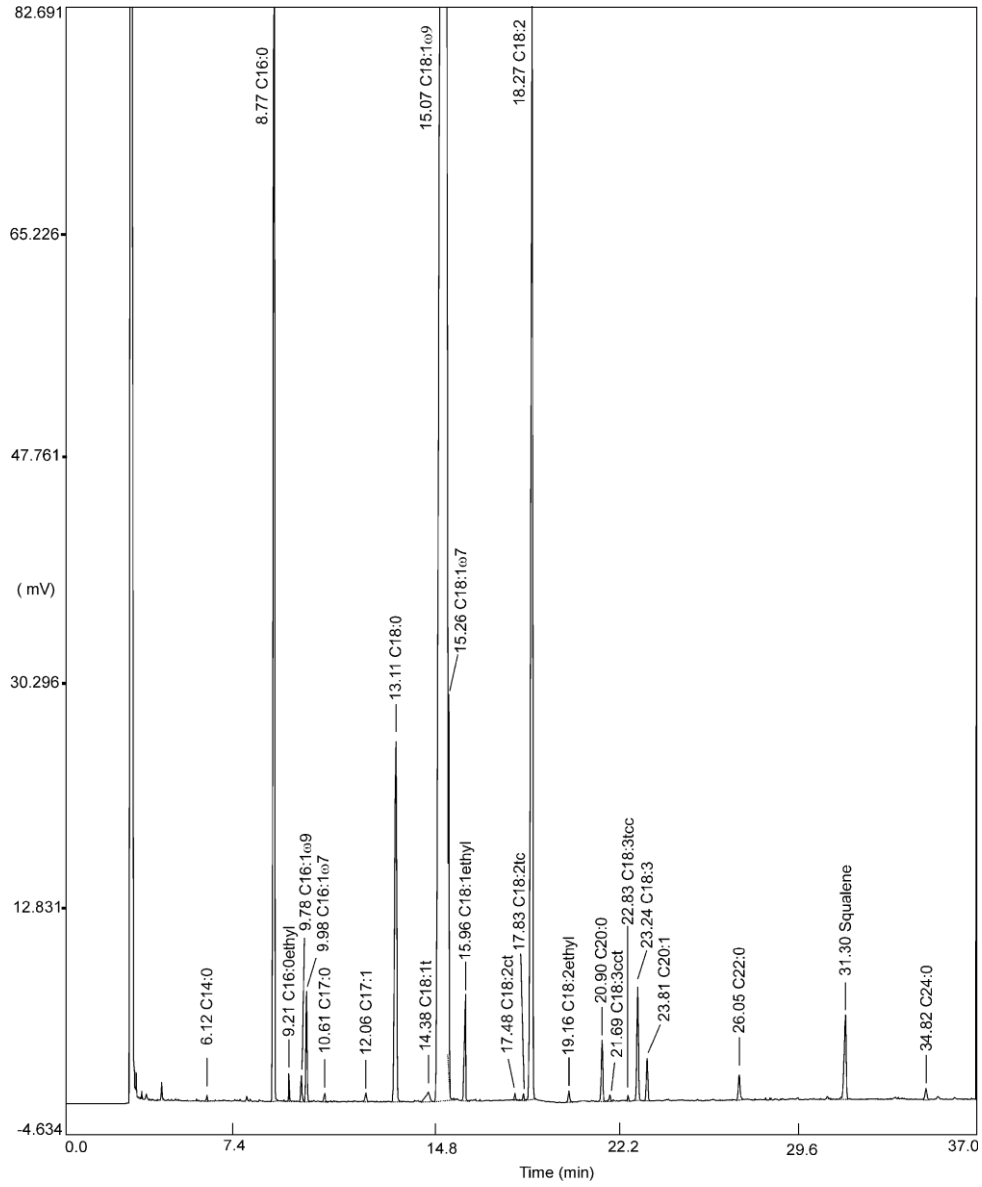


Figure 2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse au moyen d'une colonne polaire capillaire des esters alkyles des acides gras d'une huile de grignons d'olive par transestérification à froid avec une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium.

## ANNEXE I

### DÉTERMINATION DE LA COHÉRENCE ENTRE LA COMPOSITION EN TAG ET LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS AVEC UNE BASE DE DONNÉES ÉLABORÉE À PARTIR D'HUILES D'OLIVE AUTHENTIQUES

#### 1. CALCUL

##### 1.1. Composition en triacylglycérols

Pics de TAG à ECN42

LLL = pic 1

OLLn = pic 2+épaulement 2a doivent être additionnés (Note 1)

PLLn = pic 3

Note 1. Dans certaines huiles, et dans des conditions chromatographiques très bonnes, l'épaulement peut être résolu en tant que pic séparé. Dans ce cas, l'aire peut être additionnée à celle du pic 2.

Pics de TAG à ECN44

OLL = pic 4

OOLn = pic 5 + épaulement postérieur, le cas échéant (dans la Figure 1, il n'apparaît pas).

PLL = pic 6

OOLn = pic 7 + épaulement postérieur, le cas échéant (dans la Figure 1, il n'apparaît pas).

Pics de TAG à ECN46

OOL = pic 8

##### 1.2. Composition en acides gras

La Figure 2 présente le profil chromatographique d'une huile d'olive purifiée contenant des esters alkyles d'acides gras, obtenu par transméthylation dans une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium. Les pourcentages de P, Po, S, O, L, Ln, A et des acides gras doivent être calculés.

#### 2. ALGORITHMES MATHÉMATIQUES POUR CONFIRMER LA COHÉRENCE DE LA COMPOSITION EN TAG DES HUILES D'OLIVE.

##### 2.1. Paramètres pour classer les huiles en groupes

$LLL_{Théor.}$

$\Delta OOL = OOL_{Théor.} - OOL_{HPLC}$

$\Delta LLL = LLL_{HPLC} - LLL_{Théor}$

$Ln = \% \text{ acide linoléinique}$

$\Delta ECN44p = (PLL + POLn)_{HPLC} - (PLL + POLn)_{Théor}$

L'échantillon d'huile est classé dans un des huit groupes selon sa valeur  $LLL_{Théor}$  :

- a)  $\leq 0.010 \%$
- b)  $> 0.010 - \leq 0.022 \%$
- b)  $> 0.022 - \leq 0.040 \%$



- b)  $> 0.040 - \leq 0.070 \%$
- b)  $> 0.070 - \leq 0.110 \%$
- b)  $> 0.110 - \leq 0.170 \%$
- b)  $> 0.170 - \leq 0.250 \%$
- h)  $> 0.250 - \leq 0.350 \%$
- b)  $> 0.350 - \leq 0.550 \%$
- k)  $> 0.550$

Dans chaque groupe les huiles sont classées en sous-groupes selon leurs valeurs de  $\Delta OOL$  ou  $\Delta LLL$ .

## 2.2. Paramètres pour la comparaison avec la base de données.

### 2.2.1. Limite légale : $\Delta ECN42 = ECN42HPLC - ECN42Théor$ .

Le résultat devrait s'inscrire dans les limites mentionnées dans la norme commerciale, bien que cette limite ne soit pas utilisée pour vérifier la cohérence entre la composition en TAG et la composition en esters méthyliques des acides gras de l'huile dans la méthode.

### 2.2.2. Critères initiaux pour tous les groupes :

$$K1 = (LLLHPLC + OLLnHPLC) * (OLLThéor + OOLnThéor) / (LLLThéor + OLLnThéor) * (OLLHPLC + OOLnHPLC)$$

Si  $K1 \leq \text{lim.}_{inf}$ , l'huile est cohérente.

Si  $K1 > \text{lim.}_{sup}$ , l'huile n'est pas cohérente.

### 2.2.3. 1<sup>er</sup> critère : $\Delta R3 = [OLL/OOLn]HPLC - [OLL/OOLn]Théor$

Si  $\Delta R3 \leq \text{lim.}_{inf}$ , l'huile est cohérente.

Si  $\Delta R3 > \text{lim.}_{sup}$ , l'huile n'est pas cohérente.

### 2.2.4. 2<sup>e</sup> critère : $L3 = [\Delta LLL - \Delta OLLn]/OLLnThéor$

si  $L3 \leq \text{lim.}_{inf}$ , l'huile est cohérente.

Si  $L3 > \text{lim.}_{sup}$ , l'huile n'est pas cohérente.

Où  $\Delta OLLn = OLLnExp - OLLnThéor$

Pour le groupe a, le 2<sup>e</sup> critère est  $R1exp = LLLHPLC/OOLnHPLC$

Si  $R1exp \leq \text{lim.}_{inf}$ , l'huile est cohérente.

Si  $R1exp > \text{lim.}_{sup}$ , l'huile n'est pas cohérente.

### 2.2.5. 3<sup>e</sup> critère : $R1exp = LLLHPLC/OOLnHPLC$

Si  $R1exp \leq \text{lim.}_{inf}$ , l'huile est cohérente.

Si  $R1exp > \text{lim.}_{sup}$ , l'huile n'est pas cohérente.

Pour le groupe a, le 3<sup>e</sup> critère est  $L3 = [\Delta LLL - \Delta OLLn]/OLLnThéor$

si  $L3 \leq \text{lim.}_{inf}$ , l'huile est cohérente.

Si  $L3 > \text{lim.}_{sup}$ , l'huile n'est pas cohérente.

### 2.2.6. 4<sup>e</sup> critère : $\Delta R1 = [LLL/OOLn]HPLC - [LLL/OOLn]Théor$

Si  $\Delta R1 \leq \text{lim.}_{inf}$ , l'huile est cohérente.

Si  $\Delta R1 > \text{lim.}_{sup}$ , l'huile n'est pas cohérente.

Pour les groupes a, b et c  $\Delta R1$  qui n'ont qu'une limite, si la valeur de  $\Delta R1$  est inférieure ou égale, l'huile est cohérente et si la valeur de  $\Delta R1$  est supérieur à la limite, l'huile n'est pas cohérente.

### 2.2.7. 5<sup>e</sup> critère : $L4 = [\Delta LLL - \Delta OLLn]/LLLThéor$

si  $L2 \leq \text{lim.}_{inf}$ , l'huile est cohérente.

Si  $L2 > \text{lim.}_{sup}$ , l'huile n'est pas cohérente.

- 2.2.8. 6<sup>e</sup> critère :  $R2 = [\Delta OLL * LLLThéor ] / [\Delta LLL * OLLThéor ]$**   
Où  $\Delta LLL = LLLExp - LLLThéor$  et  $\Delta OOL = OOLExp - OOLThéor$   
Si  $R2 \geq$  limite, l'huile est cohérente.  
Si  $R2 <$  limite, l'huile n'est pas cohérente.

Pour les groupes e, f, g et h, le 6<sup>e</sup> critère comprend aussi le  $\Delta OOL$ . Pour le groupe j, le 6<sup>e</sup> critère comprend aussi le  $\Delta OOL$  et le  $\Delta R3$ .

### 2.3. Détermination des limites

Pour chaque sous-groupe, les limites pour certains paramètres sont données par l'équation :

$$\text{limite versus valeur } \Delta ECN44p$$

Où  $\Delta ECN44p = (PLL+POLn)Exp - (PLL+POLn)Théor$

Les 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> critères ont des limites inférieures et supérieures ( $\lim_{inf}$  et  $\lim_{sup}$ ), alors que le 6<sup>e</sup> critère n'a qu'une limite. Les groupes a, b et c ont seulement les 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> critères avec une limite supérieure et inférieure et un 4<sup>e</sup> critère avec seulement une limite.

Les valeurs de chaque critère sont comparées séquentiellement avec les limites supérieure et inférieure. Les valeurs intermédiaires indiquent que le paramètre suivant doit être comparé. La Figure 3 montre le diagramme de la procédure séquentielle.

## 3. UTILISATION DU LOGICIEL.

### 3.1. Ouvrir le programme EXCEL dans l'ordinateur.

### 3.2. Ouvrir le fichier 25AVELL\_computerprogram.xlsm

### 3.3. Activer "Macro" si nécessaire.

### 3.4. Cliquer sur le bouton "Press to initiate calculation".

### 3.5. Saisir les données uniquement dans les cases jaunes (Figure 4)

#### 3.5.1. Dans "Sample code", introduire la description de l'échantillon

#### 3.5.2. Dans "Oil category" indiquer :

"EV" pour huiles d'olive vierges comestibles (catégories vierge et vierge extra), "L" pour l'huile d'olive lampante

"R" pour l'huile d'olive raffinée et huile d'olive (mélange d'huile raffinée et d'huile vierge).

Ce code est nécessaire pour calculer la limite officielle pour  $\Delta ECN42$ .

#### 3.5.3. Dans "Introd. FAMES-GC", indiquer la composition en acides gras.

Le programme normalise automatiquement les pourcentages à la somme des huit acides gras.  
Si l'indication ;Warning; apparaît ; réviser les données des acides gras.

- 3.5.4. Indiquer les données des triacylglycérols dans les cases correspondantes. Réviser les données.**
- 3.6. Le logiciel calcule la composition théorique en triacylglycérols à partir de la composition normalisée en acides gras.**
- 3.7. À partir des pourcentages expérimental et théorique du triacylglycérol, le logiciel calcule les valeurs des algorithmes mathématiques correspondant à l'échantillon d'huile et les valeurs des limites.**
- 3.8. La commande "Press control+letter" apparaît dans la bande rouge pour indiquer la marge LLLThéor dans laquelle l'huile est classée.**
- 3.9. Pour voir les résultats, appuyer en même temps sur "control" et les lettres indiquées ; la feuille de résultats de l'échantillon d'huile est alors accessible (Figure 5).**
- 3.10. Lire les résultats dans les bandes rouges.**  
"L'huile est cohérente" indique que l'huile a une composition en TAG cohérente avec la composition en acides gras.  
"L'huile n'est pas cohérente" indique que l'huile n'a pas une composition en TAG cohérente avec la composition en acides gras et que la non-cohérence devrait être vérifiée au moyen d'autres paramètres.  
Pour chaque critère, les valeurs des algorithmes apparaissent en caractère gras. Les limites supérieure et inférieure et les valeurs des autres paramètres sont également indiquées.
- 3.11. Appuyer sur "Press to print the results" pour imprimer les résultats.**  
Deux feuilles vont s'imprimer : les données expérimentales et les valeurs et les limites pour l'échantillon.
- 3.12. Appuyer sur "Press for a new calculation" pour réinitialier le programme.**  
Toutes les données seront effacées.

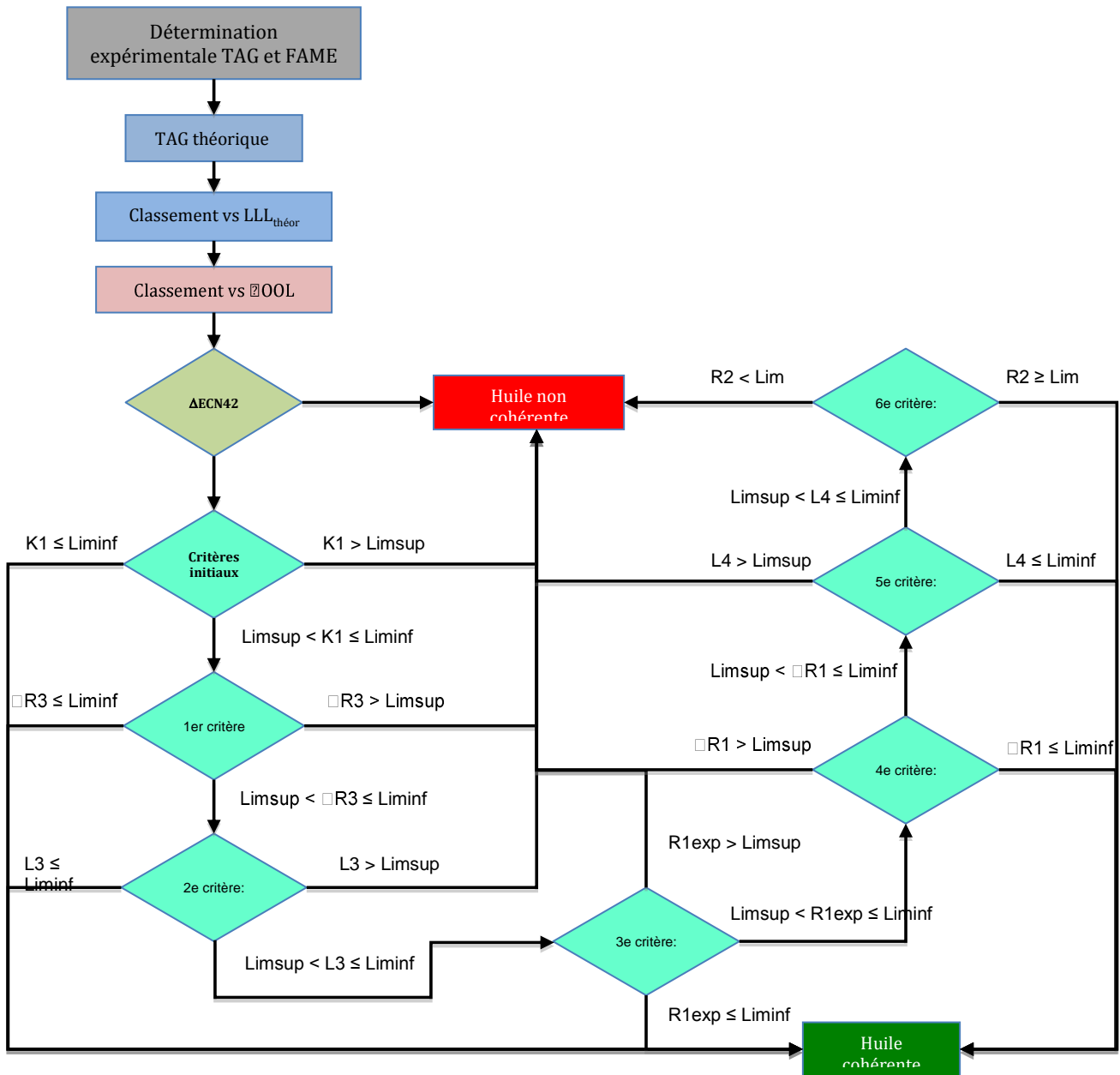


Figure 3. Diagramme de la procédure séquentielle

| EXPERIMENTAL DATA   |         |                   |       |       |       |            |       |       |        |  |
|---|---------|-------------------|-------|-------|-------|------------|-------|-------|--------|--|
| Fill only yellow cells                                    |         |                   |       |       |       |            |       |       |        |  |
| Sample Code   | VOO+VHO |                   |       |       |       |            |       |       |        |  |
| Oil Category  | R       | Refined Olive Oil |       |       |       | LLL theor: | 0,027 |       |        |  |
| Area % (GLC)  | C16:0   | C18:0             | C16:1 | C18:1 | C18:2 | C18:3      | C20:0 | C20:1 | Sum    |  |
| FAMES-Comp. Corr.   | 9,62    | 2,94              | 0,41  | 79,39 | 6,52  | 0,49       | 0,33  | 0,30  | 100,00 |  |
| Introd. FAMES-GC  | 9,62    | 2,94              | 0,41  | 79,37 | 6,52  | 0,49       | 0,33  | 0,30  | 99,98  |  |
| HPLC Experimental Data                                    |         |                   |       |       |       |            |       |       |        |  |
| ECN42   |         |                   | ECN44 |       |       |            | ECN46 |       |        |  |
| LLL   | OLLn    | PLnL              | OLL   | OLLn  | PLL   | POLn       | OOL   |       |        |  |
| 0,12  | 0,19    | 0,04              | 1,55  | 1,28  | 0,22  | 0,47       | 12,57 |       |        |  |
| Press CTRL+c to see criteria for LLL theor. 0,022 - 0,040 |         |                   |       |       |       |            |       |       |        |  |

Figure 4. Feuille de données du logiciel de calcul

| Criteria for LLL theor. 0,022 - 0,040 |         |                   |  |
|---------------------------------------|---------|-------------------|--|
| Calculation Parameters                |         |                   |  |
| Sample Code                           | VOO+VHO |                   |  |
| Oil Category                          | R       | Refined Olive Oil |  |

|                  |      |      |                                       |
|------------------|------|------|---------------------------------------|
| $\Delta ECN42 =$ | 0,13 | 0,30 | <b>Proceed to the Early Criterion</b> |
|------------------|------|------|---------------------------------------|

| Early Criterion K1                |       |              |             |
|-----------------------------------|-------|--------------|-------------|
| Parameter                         | Value | Higher Limit | Lower Limit |
| K1 =                              | 1,15  |              |             |
|                                   |       | 1,20         | 0,95        |
| <b>Proceed to the Criterion 1</b> |       |              |             |

| Criterion 1 $\Delta R3$           |       |              |             |
|-----------------------------------|-------|--------------|-------------|
| Parameter                         | Value | Higher Limit | Lower Limit |
| $\Delta R3 =$                     | 0,26  |              |             |
| $\Delta OOL =$                    | -0,69 |              |             |
| $\Delta ECN44p =$                 | 0,26  |              |             |
|                                   |       | 0,55         | 0,14        |
| <b>Proceed to the Criterion 2</b> |       |              |             |

| Criterion 2 L3                    |       |              |             |
|-----------------------------------|-------|--------------|-------------|
| Parameter                         | Value | Higher Limit | Lower Limit |
| L3 =                              | 0,41  |              |             |
| $\Delta OOL =$                    | -0,69 |              |             |
| $\Delta ECN44p =$                 | 0,26  |              |             |
|                                   |       | 0,75         | 0,25        |
| <b>Proceed to the Criterion 3</b> |       |              |             |

| Criterion 3 R1 exp.               |       |              |             |
|-----------------------------------|-------|--------------|-------------|
| Parameter                         | Value | Higher Limit | Lower Limit |
| R1 exp. =                         | 0,63  |              |             |
| $\Delta OOL =$                    | -0,69 |              |             |
| $\Delta ECN44p =$                 | 0,26  |              |             |
|                                   |       | 0,78         | 0,30        |
| <b>Proceed to the Criterion 4</b> |       |              |             |

| Criterion 4 $\Delta R1$    |       |              |             |
|----------------------------|-------|--------------|-------------|
| Parameter                  | Value | Higher Limit | Lower Limit |
| $\Delta R1 =$              | 0,47  |              |             |
| $\Delta OOL =$             | -0,69 |              |             |
| $\Delta ECN44p =$          | 0,26  |              |             |
|                            |       | 0,67         |             |
| <b>The oil is coherent</b> |       |              |             |

Press to Print Results

Press for a New Calculation

Figure 5. Feuille de résultats

## ANNEXE II

### **SÉLECTIVITÉ, SPÉCIFICITÉ ET FIABILITÉ DE LA MÉTHODE**

La méthode est basée sur un algorithme mathématique pour déterminer la cohérence ou la non-cohérence de la composition en triacylglycérols avec la composition en acides gras. Ce fait ne pouvant être vérifié qu'au moyen d'un test binaire ou d'une méthode qualitative, ses caractéristiques de performance statistique ont été évaluées au moyen d'algorithmes qualitatifs. Les principales propriétés des méthodes qualitatives sont la sélectivité, la spécificité et la fiabilité.

La sélectivité est définie comme la capacité de la méthode à produire des résultats qui dépendent exclusivement du mesurande. La sélectivité est quantifiée par le rapport entre le nombre de tests positifs réels et la somme des nombres de vrais positifs et des faux négatifs.

La spécificité est définie comme le niveau ultime de sélectivité qui est l'absence absolue d'interférences. La spécificité est exprimée comme le rapport entre le nombre de vrais négatifs et la somme de ceux-ci et du nombre de faux positifs.

La fiabilité est la conséquence des propriétés analytiques précédentes et elle est formulée comme le complément de la somme des probabilités d'erreurs du premier et du second type. La première erreur est définie comme le rapport entre le nombre de faux positifs et le nombre total d'échantillons adultérés, tandis que la dernière erreur est le rapport entre le nombre de faux négatifs et le nombre total d'échantillons authentiques.

Les méthodes de test qualitatives sont basées sur des réponses binaires, 3 niveaux de référence quantitatifs sont impliqués pour les produire, à savoir la limite de détection, la limite de coupure et la limite de seuil. Les limites de coupure et de seuil permettent de déterminer les zones de concentration de l'adultérant dans lesquelles la réponse binaire correcte se produit : *Non*, en deçà des limites ; *Oui*, au dessus. Le tableau 3 montre les valeurs des limites citées, estimées en réalisant une série d'expériences à des concentrations croissantes d'huiles de noisette dans les huiles d'olive et en déterminant ainsi la probabilité associée à la limite de coupure (8% avec probabilité de 94 %). La valeur limite du seuil a été fixée à 10% parce que les ellipses de confiance à 94 % de la PCA ne comprenaient aucun échantillon additionné de 10%.

Les données du tableau 1 montrent les caractéristiques de performance de la méthode calculées à partir de l'essai collaboratif à trois effectué par le COI.

**Tableau 1 :**

| <b>Caractéristiques de performance</b> | <b>Valeurs, en %</b> |
|--|----------------------|
| <b>Sensibilité</b>                     | 86                   |
| <b>Sélectivité</b>                     | 94                   |
| <b>Limite de détection</b>             | 5                    |
| <b>Limite de coupure</b>               | 8                    |
| <b>Limite de seuil</b>                 | 10                   |