



MÉTHODE DE DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN MÉTHANOL ET EN ÉTHANOL DES HUILES D'OLIVE VIERGES

1. Objet et champ d'application

Cette méthode est applicable à la détermination de la teneur en méthanol (MeOH) et en éthanol (EtOH) des huiles d'olive vierges.

2. Principe

L'échantillon est chauffé à 110 °C dans un flacon fermé hermétiquement jusqu'à désorption complète du MeOH et de l'EtOH dans la phase gazeuse. Lorsque l'équilibre est atteint, une portion spécifique de la phase gazeuse est injectée dans la colonne de chromatographie en phase gazeuse, à travers laquelle le MeOH et l'EtOH sont séparés puis détectés à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le MeOH et l'EtOH sont les principaux pics du chromatogramme et sont quantifiés en utilisant le 1-propanol (PrOH) comme étalon interne (IS).

3. Matériel et réactifs de laboratoire

- 3.1** Flacons, 20 mL (75 mm de haut x 22 mm de large, environ)
- 3.2** Bouchons sertis en aluminium avec septum en PTFE/silicone (20 mm id)
- 3.3** Pince à sertir
- 3.4** Pipette graduée pour le dosage automatique, 500 µL
- 3.5** Flacon en verre à bouchon à vis, 50 mL
- 3.6** Balance analytique ($\pm 0,0001$ g)
- 3.7** 1-Propanol (PrOH), qualité analytique (pureté de 99,8 %, densité de 0,803 g/mL)
- 3.8** Huile de grignons d'olive raffinée chimiquement ou autre huile raffinée non volatile.

4. Appareillage et conditions d'essai

Les instructions données concernent l'équipement habituel utilisé pour la chromatographie en phase gazeuse, à savoir un échantillonneur d'espace de tête, des colonnes capillaires et un FID.

4.1 Échantillon de l'espace de tête

Température du four : 110 °C

Température de la boucle : 115 °C

Température de la ligne de transfert : 120 °C

Équilibrage du flacon : 60 min

Durée de l'injection : 0,5 min

Secouer le flacon

4.2 Chromatographe en phase gazeuse

4.2.1 Entrée H₂

Chauffage : 150 °C

Pression : 8,9 psi

Débit total : 79,5 mL/min

Rapport de division : 50:1

Débit fractionné : 75 mL/min

4.2.2 Colonne capillaire

HP-88 ou équivalent : 30 m x 250 µm x 0,2 µm

Pression : 8,9 psi

Débit : 1,5 mL/min

Vitesse moyenne : 41,8 cm/sec.

4.2.3 Four : Le four doit être capable de chauffer la colonne capillaire à au moins 260 °C et de maintenir la température souhaitée à 0,1 °C près. Cette dernière exigence est importante lors de l'utilisation de colonnes en silice fondue. L'utilisation d'un chauffage programmé en fonction de la température est recommandée :

Température initiale : 50 °C, maintenir pendant 4 min.

Vitesse : 30 °C/min jusqu'à 150 °C, maintien pendant 2,5 min.

4.2.4 FID

Chauffage : 150 °C

Débit de H₂ : 30 mL/min

Débit d'air : 400 mL/min

Débit d'appoint (combiné) : 25 mL/min

4.2.5 Système d'acquisition de données permettant l'intégration et la normalisation des pics.

5. Procédure

5.1 Préparation de la solution de l'étalon interne

Une solution de travail de PrOH (3.7), préparée comme suit, est utilisée comme étalon interne (IS) pour la détermination quantitative de MeOH et EtOH :

- A) Préparer une solution mère à partir d'une huile raffinée non volatile (3.8) : à l'aide d'une pipette automatique graduée (3.4), ajouter 1200 µL de PrOH (3.7) refroidi à 4 °C à 96 g d'huile raffinée non volatile (3.8) dans un flacon en verre à bouchon à vis (3.5) et homogénéiser. Conserver à 4 °C.
- B) Préparer la solution de travail IS en diluant 1 g de la solution mère dans 24 g de l'huile raffinée exempte de substances volatiles (3.8) dans un flacon en verre à bouchon à vis (3.5) et homogénéiser. Conserver à 4 °C.

5.2 Préparation des échantillons

Peser environ 3 g d'huile dans un flacon en verre transparent (3.1). Ajouter 300 mg de la solution de travail IS refroidie (B), fermer rapidement la fiole avec un bouchon à sertir en aluminium (3.2) et sceller hermétiquement avec une pince à sertir (3.3).

6. Expression des résultats

La concentration de MeOH et d'EtOH est calculée par rapport à l'IS. Ainsi, la teneur d'un composé *i* (*w_i*), exprimée en mg/kg, est obtenue au moyen de la formule suivante :

$$W_i = 1000 \times A_i \times m_{IS} / m \times A_{IS}$$

Où :

A_i est la surface du composé *i* divisée par le facteur de réponse correspondant (voir

annexe).

A_{IS} est la zone de PrOH ;

m est la masse de l'échantillon, en g ;

m_{IS} est la masse de PrOH ajoutée à l'échantillon, en mg.

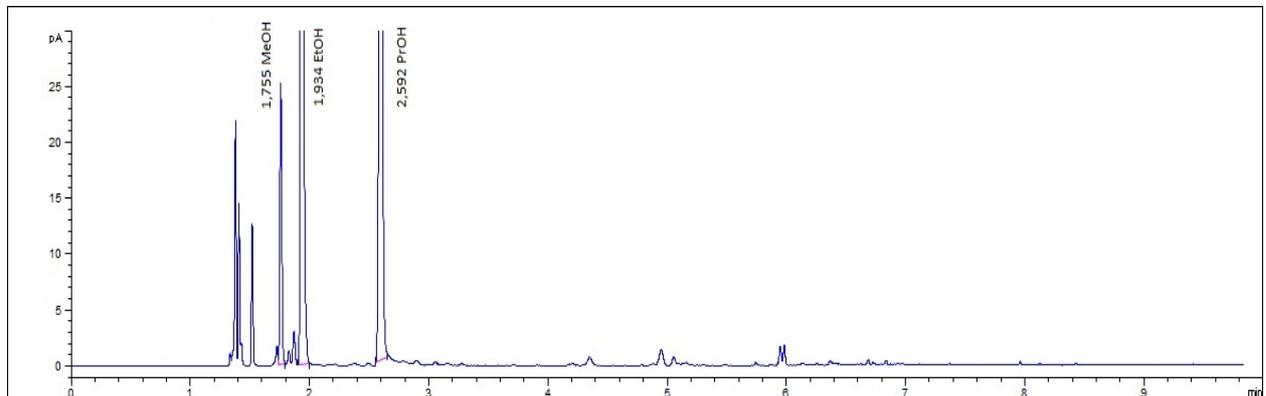
Les résultats sont exprimés en mg/kg avec deux décimales.

7. Rapport d'essai

Le rapport d'essai précisera les méthodes utilisées pour la préparation de l'échantillon et pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. Il mentionnera également tous les détails opératoires non spécifiés dans cette méthode ou considérés comme facultatifs, ainsi que les détails de tout incident ayant pu influencer les résultats.

Le rapport d'essai doit comprendre toutes les informations nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

8. Chromatogramme de l'échantillon



ANNEXE

Informations complémentaires

1. Calcul du facteur de réponse

Le facteur de réponse de MeOH et EtOH au PrOH (IS) peut être calculé en analysant un ensemble d'échantillons de différentes concentrations en double. Le rapport entre les surfaces donnera le facteur de réponse. Un exemple de calcul est donné ci-dessous.

Echan- tillon	ppm MeOH	ppm EtOH	ppm PrOH	Aire PrOH	Aire MeOH	Aire EtOH	EtOH/ PrOH	MeOH/ PrOH
1A	5,015	5,015	5,015	19,356	27,536	31,266	1,62	1,42
1B	5,015	5,015	5,015	19,557	27,371	31,471	1,61	1,40
1C	5,015	5,015	5,015	20,703	27,479	31,479	1,52	1,33
2A	10,093	10,093	10,093	40,429	54,741	62,698	1,55	1,35
2B	10,093	10,093	10,093	39,573	53,812	61,821	1,56	1,36
2C	10,093	10,093	10,093	38,836	52,854	61,149	1,57	1,36
3A	30,135	30,135	30,135	122,370	167,874	189,646	1,55	1,37
3B	30,135	30,135	30,135	120,586	160,794	184,109	1,53	1,33
3C	30,135	30,135	30,135	121,207	156,693	182,022	1,50	1,29

Facteur de réponse EtOH = 1,56 (SD = 0,04 ; 3SD = 0,12 ; RSD % = 7)

Facteur de réponse MeOH = 1,36 (SD = 0,04 ; 3SD = 0,12 ; RSD % = 9)

2. Validation de la méthode

La précision de la méthode a été établie en 2019 dans le cadre d'un essai interlaboratoire réalisé conformément aux normes ISO 5725-1 [7] et ISO 5725-2 [8]. Onze laboratoires (d'Australie, de France, d'Allemagne, d'Italie, du Maroc, d'Espagne, de Tunisie et des États-Unis) ont participé à cet essai.

Tableau 2.1 Résumé des résultats statistiques pour le MeOH

Échantillon	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires participants (P)	11	11	11	11	11
Nombre de laboratoires retenus après élimination des valeurs aberrantes (p)	9	9	10	8	9
Nombre de résultats d'essais individuels de tous les laboratoires sur chaque échantillon (z)	18	18	20	16	18
Valeur moyenne (m), (mg/kg)	1,93	8,87	9,94	6,27	6,36
Écart-type de répétabilité (sr), (mg/kg)	0,164	0,503	0,518	0,321	0,407
Coefficient de variation de la répétabilité (CVsr), %.	8,45	5,66	5,21	5,11	6,38
Limite de répétabilité (r), (sr* 2,8), (mg/kg)	0,46	1,41	1,45	0,90	1,14
Écart-type de reproductibilité (sR), (mg/kg)	0,371	2,192	1,293	1,571	1,207
Coefficient de variation de la reproductibilité (CVsR), %.	19,31	24,70	13,01	25,07	18,99
Limite de reproductibilité (R) (sR* 2,8), (mg/kg)	1,04	6,14	3,62	4,40	3,38
HoR	1,33	2,14	1,15	2,07	1,57

Tableau 2.2 Résumé des résultats statistiques pour l'EtOH

Échantillon	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires participants (P)	11	11	11	11	11
Nombre de laboratoires retenus après élimination des valeurs aberrantes (p)	10	9	9	9	9
Nombre de résultats d'essais individuels de tous les laboratoires sur chaque échantillon (z)	20	18	18	18	18
Valeur moyenne (m), (mg/kg)	10,17	2,13	44,21	6,34	27,28
Écart-type de répétabilité (sr), (mg/kg)	0,961	0,225	2,343	0,279	1,714
Coefficient de variation de la répétabilité (CVsr), %.	10,15	10,56	5,30	4,37	6,29
Limite de répétabilité (r), (sr* 2,8), (mg/kg)	2,69	0,63	6,56	0,78	4,80
Écart-type de reproductibilité (sR), (mg/kg)	2,879	0,557	6,721	0,632	4,286
Coefficient de variation de la reproductibilité (CVsR), %.	28,31	26,06	15,20	9,97	15,71
Limite de reproductibilité (R) (sR* 2,8), (mg/kg)	8,06	1,56	18,82	1,77	12,00
HoR	2,51	1,83	1,68	0,82	1,61