



## **MÉTHODE D' ANALYSE**

### **ANALYSE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DANS L'ULTRAVIOLET**

#### **PRÉLIMINAIRES**

L'examen spectrophotométrique dans l'ultraviolet peut fournir des indications sur la qualité d'une matière grasse, sur son état de conservation et sur les modifications dues aux processus technologiques.

Les absorbances aux longueurs d'onde prévues dans la méthode sont dues à la présence de systèmes diéniques et triéniques conjugués. Les valeurs de ces absorbances sont exprimées comme extinction spécifique  $E_{1cm}^{1\%}$  (extinction d'une solution de matière grasse à 1% dans le solvant prescrit, pour une épaisseur de 1 cm) notée de façon conventionnelle par K (dit également coefficient d'extinction).

#### **1. OBJET**

La méthode décrit le procédé pour l'exécution de l'examen spectrophotométrique dans l'ultraviolet des matières grasses.

#### **2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE**

La matière grasse étudiée est dissoute dans le solvant requis, puis l'extinction de la solution est déterminée aux longueurs d'onde prescrites, par rapport au solvant pur. Les extinctions spécifiques sont calculées à partir des lectures spectrophotométriques.

#### **3. APPAREILLAGE**

- 3.1. Spectrophotomètre pour mesures d'extinction dans l'ultraviolet entre 220 et 360 nm, avec possibilité de lecture pour chaque unité nanométrique.
- 3.2. Cuves de quartz prismatiques, avec couvercle, de parcours optique de 1 centimètre. Les cuves, remplies d'eau ou d'un autre solvant approprié, ne doivent pas présenter, entre elles, de différences supérieures à 0,01 unité d'extinction.

- 3.3. Fioles jaugées de 25 millilitres.
- 3.4. Colonne pour chromatographie de 450 millimètres de long et 35 millimètres de diamètre, équipée d'un tube d'écoulement d'un diamètre d'environ 10 millimètres.

#### **4. RÉACTIFS**

- 4.1. Isooctane (2,2,4-triméthylpentane) spectrophotométriquement pur: il doit avoir, par rapport à l'eau distillée, une transmittance non inférieure à 60% à 220 nm et non inférieure à 95% à 250 nm,

ou bien

- cyclohexane spectrophotométriquement pur: il doit avoir, par rapport à l'eau distillée, une transmittance non inférieure à 40% à 220 nm et non inférieure à 95% à 250 nm,
- un autre solvant approprié capable de dissoudre complètement la matière grasse.

#### **5. PROCÉDÉ**

- 5.1. L'échantillon examiné doit être parfaitement homogène et exempt d'impuretés en suspension. Les huiles liquides à température ambiante sont filtrées sur papier à une température d'environ 30°C; les graisses solides sont homogénéisées et filtrées à une température ne dépassant le point de fusion que de 10°C au maximum.
- 5.2. Peser exactement 0,25 gramme de l'échantillon ainsi préparé dans une fiole jaugée de 25 millilitres, compléter avec le solvant prescrit et homogénéiser.

La solution obtenue doit être parfaitement limpide. Au cas où la solution présenterait une opalescence ou un trouble, filtrer rapidement sur papier.

- 5.3. Remplir une cuve avec la solution obtenue et mesurer les extinctions, en utilisant comme référence le solvant employé, aux longueurs d'onde comprises entre 232 et 276 nm.

Les valeurs d'extinction doivent être comprises dans l'intervalle de 0,1 à 0,8; dans le cas contraire, il est nécessaire de répéter les mesures en utilisant, selon le cas, des solutions plus concentrées ou plus diluées.

- 5.4. Au cas où la détermination de l'extinction spécifique après passage sur alumine serait requise, procéder de la façon suivante: introduire dans la colonne chromatographique 30 grammes d'alumine basique en suspension dans l'hexane; après tassement de l'adsorbant, éliminer l'excès d'hexane jusqu'à 1 centimètre environ au-dessus du niveau supérieur de l'alumine.

Dissoudre 10 grammes de matière grasse, homogénéisée et filtrée comme décrit au point 5.1, dans 100 millilitres d'hexane et verser cette solution dans la colonne. Recueillir l'éluat et évaporer totalement le solvant sous vide à une température inférieure à 25°C.

Procéder immédiatement sur la matière grasse ainsi obtenue comme indiqué au point 5.2.

- 5.5. La longueur d'onde maximale sera de 268 nm ou de 270 nm selon le solvant utilisé: iso-octane ou cyclohexane respectivement.

## 6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

- 6.1. Rapporter les extinctions spécifiques (coefficients d'extinction) aux différentes longueurs d'onde, calculées comme suit:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s}$$

où:

$K_{\lambda}$  : extinction spécifique à la longueur d'onde  $\lambda$  ;

$E_{\lambda}$  : extinction mesurée à la longueur d'onde  $\lambda$  ;

$c$  : concentration de la solution en grammes par 100 millilitres;

$s$  : épaisseur de la cuvette en centimètres.

Les résultats sont exprimés avec deux décimales.

- 6.2. L'examen spectrophotométrique de l'huile d'olive selon la méthode officielle des règlements officiels de la Communauté Économique Européenne prévoit la détermination de l'extinction spécifique, en solution dans l'iso-octane, aux longueurs d'onde de 232 et 270 nm et la détermination de la variation de l'extinction spécifique ( $\Delta K$ ) exprimée comme suit:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

où  $K_m$  est l'extinction spécifique à la longueur d'onde  $m$ , longueur d'onde d'absorbance maximale aux environs de 270 nm.

NOTE: Longueurs d'onde maximales de 268 nm et de 232 nm avec l'iso-octane et de 270 nm et 232 nm avec le cyclohexane.

## APPENDICE I

### Étalonnage du spectrophotomètre

- A.2. L'appareillage doit être contrôlé périodiquement (au moins tous les six mois), aussi bien pour la réponse de la longueur d'onde que pour l'exactitude de la réponse.
- A.2.1. Le contrôle de la réponse de la longueur d'onde peut être fait au moyen d'une lampe à vapeur de mercure ou de filtres appropriés.
- A.2.2. Pour le contrôle de la cellule photoélectrique et du photomultiplicateur, procéder ainsi: peser 0,2000 gramme de chromate de potassium pur pour spectrophotométrie et dissoudre dans une solution d'hydroxyde de potassium 0,05 N et compléter au volume dans une fiole jaugée de 1000 millilitres. Prélever ensuite 25 millilitres exactement de la solution obtenue, transférer dans une fiole jaugée de 500 millilitres et compléter au volume avec la même solution d'hydroxyde de potassium .

Mesurer l'extinction à 275 nm de la solution ainsi obtenue, en se servant de la solution d'hydroxyde de potassium comme référence. L'extinction mesurée avec une cuve de 1 centimètre devra être de  $0,200 \pm 0,005$ .

## 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 de:

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <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 au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95 % , la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur l'échantillon identique soumis à l'essai, dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage et pendant un court intervalle de temps |
| <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 au dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95 %, la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'essai individuels obtenus à l'aide de la même méthode sur un échantillon identique soumis à l'essai, dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant un appareillage différent

**S<sub>R</sub>** Écart-type de reproductibilité

**RSD<sub>R</sub> (%)** Coefficient de variation de reproductibilité ( $S_R \times 100 / \text{mean}$ )

### Absorbance dans l'ultraviolet

#### - à 270 nm

|                            | A     | B     | C     | D     | E     |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>n</b>                   | 17    | 18    | 18    | 18    | 18    |
| <b>outliers</b>            | 3     | 0     | 1     | 0     | 5     |
| <b>mean</b>                | 0.110 | 0.253 | 0.202 | 0.212 | 0.561 |
| <b>r</b>                   | 0.006 | 0.009 | 0.012 | 0.015 | 0.018 |
| <b>S<sub>r</sub></b>       | 0.002 | 0.004 | 0.004 | 0.006 | 0.007 |
| <b>RSD<sub>r</sub> (%)</b> | 1.961 | 1.431 | 2.283 | 2.691 | 1.191 |
| <b>R</b>                   | 0.016 | 0.026 | 0.021 | 0.031 | 0.020 |
| <b>S<sub>R</sub></b>       | 0.006 | 0.009 | 0.008 | 0.011 | 0.007 |
| <b>RSD<sub>R</sub> (%)</b> | 5.052 | 3.770 | 3.872 | 5.470 | 1.302 |

#### -Delta K

|                            | A     | B     | C      | D      | E      |
|----------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|
| <b>n</b>                   | 17    | 18    | 18     | 18     | 18     |
| <b>outliers</b>            | 1     | 2     | 0      | 1      | 1      |
| <b>mean</b>                | 0.000 | 0.020 | 0.010  | 0.003  | 0.040  |
| <b>r</b>                   | -     | 0.000 | 0.003  | 0.002  | 0.007  |
| <b>S<sub>r</sub></b>       | -     | 0.001 | 0.001  | 0.001  | 0.003  |
| <b>RSD<sub>r</sub> (%)</b> | -     | 7.720 | 17.920 | 25.660 | 6.421  |
| <b>R</b>                   | -     | 0.004 | 0.006  | 0.004  | 0.017  |
| <b>S<sub>R</sub></b>       | -     | 0.002 | 0.002  | 0.002  | 0.006  |
| <b>RSD<sub>R</sub> (%)</b> | -     | 8.271 | 37.021 | 50.201 | 14.210 |

## 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

**Table A.1 — UV extinction at 232 nm in isooctane**

| Sample  | A      | B      | C      | D      | E      |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| No. participating laboratories, $n_p$                       | 21     | 22     | 22     | 22     | 22     |
| No. laboratories retained after eliminating outliers, $n_p$ | 20     | 18     | 18     | 21     | 17     |
| No. test results in all labs, $n_t$                         |        |        |        |        |        |
| Mean, $K_{232}$   | 1,76   | 2,10   | 3,81   | 3,85   | 2,82   |
| Repeatability standard deviation, $s_r$                     | 0,0259 | 0,0126 | 0,0155 | 0,0359 | 0,0193 |
| Coefficient of variation of repeatability, $CV(r)$ , %      | 1,47   | 0,60   | 0,41   | 0,93   | 0,69   |
| Repeatability limit, $r$                                    | 0,073  | 0,035  | 0,043  | 0,101  | 0,054  |
| Reproducibility standard deviation, $s_R$                   | 0,0773 | 0,0692 | 0,174  | 0,2108 | 0,0694 |
| Coefficient of variation of reproducibility, $CV(R)$ , %    | 4,38   | 3,29   | 4,58   | 5,48   | 2,46   |
| Reproducibility limit, $R$                                  | 0,216  | 0,194  | 0,488  | 0,590  | 0,194  |

**Table A.2 — UV extinction at 232 nm in cyclohexane**

| Sample  | A      | B      | C      | D      | E      |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| No. participating laboratories, $n_p$                       | 21     | 21     | 21     | 21     | 21     |
| No. laboratories retained after eliminating outliers, $n_p$ | 18     | 20     | 20     | 21     | 21     |
| No. test results in all labs, $n_t$                         |        |        |        |        |        |
| Mean, $K_{232}$   | 1,76   | 2,12   | 3,83   | 3,86   | 2,79   |
| Repeatability standard deviation, $s_r$                     | 0,0250 | 0,0216 | 0,0423 | 0,0405 | 0,0332 |
| Coefficient of variation of repeatability, $CV(r)$ , %      | 1,42   | 1,02   | 1,11   | 1,05   | 1,19   |
| Repeatability limit, $r$                                    | 0,070  | 0,060  | 0,119  | 0,113  | 0,093  |
| Reproducibility standard deviation, $s_R$                   | 0,0493 | 0,0730 | 0,1513 | 0,1378 | 0,0996 |
| Coefficient of variation of reproducibility, $CV(R)$ , %    | 2,81   | 3,44   | 3,95   | 3,57   | 3,57   |
| Reproducibility limit, $R$                                  | 0,138  | 0,204  | 0,424  | 0,386  | 0,279  |



**Table A.3 — UV extinction at 268 nm in isoctane**

| Sample  | A      | B      | C      | D      | E      |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| No. participating laboratories, $n_p$                       | 21     | 22     | 22     | 22     | 22     |
| No. laboratories retained after eliminating outliers, $n_p$ | 20     | 18     | 20     | 17     | 20     |
| No. test results in all labs, $n_t$                         |        |        |        |        |        |
| Mean, $K_{268}$   | 0,12   | 0,43   | 1,14   | 0,45   | 0,60   |
| Repeatability standard deviation, $s_r$                     | 0,0049 | 0,0050 | 0,0155 | 0,0066 | 0,0066 |
| Coefficient of variation of repeatability, $CV(r)$ , %      | 3,96   | 1,17   | 1,36   | 1,46   | 1,10   |
| Repeatability limit, $r$                                    | 0,014  | 0,014  | 0,043  | 0,018  | 0,019  |
| Reproducibility standard deviation, $s_R$                   | 0,0099 | 0,0159 | 0,0296 | 0,0134 | 0,0335 |
| Coefficient of variation of reproducibility, $CV(R)$ , %    | 8,00   | 3,75   | 2,59   | 2,98   | 5,60   |
| Reproducibility limit, $R$                                  | 0,028  | 0,045  | 0,083  | 0,038  | 0,094  |

**Table A.4 — UV extinction at 270 nm in cyclohexane**

| Sample  | A      | B      | C      | D      | E      |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| No. participating laboratories, $n_p$                       | 21     | 21     | 21     | 21     | 21     |
| No. laboratories retained after eliminating outliers, $n_p$ | 20     | 19     | 20     | 20     | 17     |
| No. test results in all labs, $n_t$                         |        |        |        |        |        |
| Mean, $K_{270}$   | 0,13   | 0,43   | 1,12   | 0,45   | 0,59   |
| Repeatability standard deviation, $s_r$                     | 0,0052 | 0,0083 | 0,0103 | 0,0118 | 0,0064 |
| Coefficient of variation of repeatability, $CV(r)$ , %      | 4,02   | 1,93   | 0,92   | 2,63   | 1,08   |
| Repeatability limit, $r$                                    | 0,014  | 0,023  | 0,0289 | 0,033  | 0,018  |
| Reproducibility standard deviation, $s_R$                   | 0,0109 | 0,0157 | 0,0265 | 0,0144 | 0,0148 |
| Coefficient of variation of reproducibility, $CV(R)$ , %    | 8,51   | 3,66   | 2,37   | 3,20   | 2,52   |
| Reproducibility limit, $R$                                  | 0,031  | 0,044  | 0,074  | 0,040  | 0,042  |

**Table A.5 — Variation of the specific extinction  $\otimes K$  at  $(270 \pm 4)$  nm in cyclohexane**

| Sample  | A       | B      | C      | D      | E      |
|---|---------|--------|--------|--------|--------|
| No. participating laboratories, $n_p$                       | 20      | 21     | 21     | 21     | 21     |
| No. laboratories retained after eliminating outliers, $n_p$ | 19      | 20     | 19     | 20     | 18     |
| No. test results in all labs, $n_t$                         |         |        |        |        |        |
| Mean, $\otimes K$   | - 0,002 | 0,002  | 0,085  | 0,035  | 0,047  |
| Repeatability standard deviation, $s_r$                     | 0,0006  | 0,0005 | 0,0009 | 0,0010 | 0,0014 |
| Coefficient of variation of repeatability, $CV(r)$ , %      | 28,90   | 21,61  | 1,09   | 2,86   | 2,90   |
| Repeatability limit, $r$                                    | 0,0016  | 0,0015 | 0,0026 | 0,0028 | 0,0038 |
| Reproducibility standard deviation, $s_R$                   | 0,0029  | 0,0013 | 0,0043 | 0,0026 | 0,0038 |
| Coefficient of variation of reproducibility, $CV(R)$ , %    | 147,51  | 51,97  | 5,06   | 7,58   | 8,13   |
| Reproducibility limit, $R$                                  | 0,0080  | 0,0036 | 0,0121 | 0,0068 | 0,0106 |

**Table A.6 — Variation of the specific extinction  $\otimes K$  at  $(268 \pm 4)$  nm in isooctane**

| Sample  | A       | B      | C      | D      | E      |
|---|---------|--------|--------|--------|--------|
| No. participating laboratories, $n_p$                       | 21      | 21     | 22     | 22     | 22     |
| No. laboratories retained after eliminating outliers, $n_p$ | 21      | 18     | 21     | 20     | 20     |
| No. test results in all labs, $n_t$                         |         |        |        |        |        |
| Mean, $\otimes K$   | - 0,002 | 0,000  | 0,082  | 0,031  | 0,042  |
| Repeatability standard deviation, $s_r$                     | 0,0009  | 0,0005 | 0,0019 | 0,0014 | 0,0007 |
| Coefficient of variation of repeatability, $CV(r)$ , %      | 36,44   | 121,08 | 2,27   | 4,38   | 1,65   |
| Repeatability limit, $r$                                    | 0,0025  | 0,0014 | 0,0052 | 0,0038 | 0,0020 |
| Reproducibility standard deviation, $s_R$                   | 0,0036  | 0,0010 | 0,0082 | 0,0039 | 0,0045 |
| Coefficient of variation of reproducibility, $CV(R)$ , %    | 148,18  | 234,77 | 10,00  | 12,63  | 10,63  |
| Reproducibility limit, $R$                                  | 0,0101  | 0,0027 | 0,0229 | 0,0110 | 0,0126 |

### Normative references

ISO 5725-1: 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions

ISO 5725-2: 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of the repeatability and reproducibility of a standard measurement method

ISO 5725-5: 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method

ISO 5725-6: 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values