



MÉTHODE D'ANALYSE

ANALYSE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DANS L'ULTRAVIOLET

AVANT-PROPOS

L'analyse spectrophotométrique dans l'ultraviolet peut fournir des indications sur la qualité d'une matière grasse, sur son état de conservation et sur les modifications subies du fait des processus technologiques qui lui sont appliqués.

L'absorption aux longueurs d'onde spécifiée dans la méthode est due à la présence de systèmes de diènes et triènes conjugués résultant de processus d'oxydation et/ou de pratiques de raffinage. Les valeurs de cette absorption sont exprimées comme l'extinction spécifique $E_{1\%}$ (l'extinction d'une solution de matière grasse à 1% (m/V) dans le solvant spécifié, dans une cuve de 10 mm) notée de façon conventionnelle K (également dénommé « coefficient d'extinction »).

1. DOMAINE D'APPLICATION

La méthode décrit la procédure à suivre pour réaliser une analyse spectrophotométrique de l'huile d'olive dans l'ultraviolet.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Un échantillon est dissout dans le solvant prescrit puis on détermine l'extinction de la solution aux longueurs d'onde spécifiées, par rapport au solvant pur.

On calcule l'absorbance spécifique à 232 nm et 268 nm dans l'isooctane ou à 232 nm et 270 nm dans le cyclohexane pour une concentration de 1% (m/V) dans une cuve de 10 mm.

3. APPAREILLAGE

- 3.1. Spectrophotomètre pour mesurer l'extinction dans l'ultraviolet entre 220 et 360 nm, avec possibilité de lecture nanométrique. Il est recommandé de vérifier régulièrement la précision et la reproductibilité des échelles d'absorbance et de longueur d'onde, ainsi que l'absence de lumière parasite.

3.1.1. *Échelle des longueurs d'onde* : Ce contrôle peut être réalisé à l'aide d'un matériau de référence consistant en un filtre de verre optique contenant de l'oxyde d'holmium ou d'une solution d'oxyde d'holmium (scellée ou non) qui possède des bandes d'absorption distinctes. Ce matériau de référence est destiné à la vérification et à l'étalonnage de l'échelle des longueurs d'onde des spectrophotomètres UV-visible dont la largeur de bande spectrale nominale est inférieure ou égale à 5 nm. Le filtre de verre est mesuré en mode d'absorbance en comparaison avec un blanc à l'air, sur la plage de longueurs d'onde comprise entre 640 à 240 nm, conformément aux instructions indiquées dans le certificat du matériau de référence. Pour chaque largeur de bande spectrale, on procède à une correction des valeurs initiales à l'aide d'un porte-cuve vide. Les longueurs d'onde de la norme sont énumérées dans le certificat du matériau de référence.

3.1.2. *Échelle d'absorbance* : Le contrôle peut être effectué au moyen de matériaux de référence scellés disponibles dans le commerce, consistant en solutions de dichromate de potassium, avec certaines concentrations et valeurs certifiées d'absorbance à λ_{\max} (quatre solutions de dichromate de potassium dans de l'acide perchlorique, scellées dans quatre cuves UV en quartz, qui sont utilisées pour mesurer la linéarité et la précision photométrique de référence dans l'UV). Les solutions de dichromate de potassium sont mesurées en comparaison avec un blanc contenant l'acide utilisé, après correction des valeurs de base, conformément aux instructions accompagnant le matériel de référence. Les valeurs d'absorbance sont énumérées dans le certificat du matériau de référence.

Pour le contrôle de la cellule photoélectrique et du photomultiplicateur, il est également possible de procéder ainsi : peser 0,2 g 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 ml. Prélever ensuite 25 ml exactement de la solution obtenue, transférer dans une fiole jaugée de 500 ml 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 optique de 1 cm devra être de $0,200 \pm 0,005$.

3.2. Cuves en quartz rectangulaires, avec couvercle, adéquates pour mesurer l'extinction dans l'ultraviolet entre 220 et 360 nm, d'une longueur optique de 10 mm. 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 ml, classe A.

3.4. Balance analytique, permettant une lecture au 0,0001 g près.

4. RÉACTIFS

Au cours de l'analyse, sauf indication contraire, il convient d'utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

Solvant : Isooctane (2,2,4-triméthylpentane) pour la mesure à 232 nm et à 268 nm et cyclohexane pour la mesure à 232 nm et à 270 nm, présentant une absorbance inférieure à 0,12 à 232 nm et inférieure à 0,05 à 270 nm par rapport à l'eau distillée, mesurée dans une cuve de 10 mm

5. PROCÉDURE

- 5.1. L'échantillon en question doit être parfaitement homogène et exempt d'impuretés en suspension. Si ce n'est pas le cas, il doit être filtré sur papier à une température d'environ 30 °C.
- 5.2. Peser exactement 0,25 gramme (à 0,1 mg près) de l'échantillon ainsi préparé dans une fiole jaugée de 25 millilitres, compléter avec le solvant prescrit et homogénéiser¹. La solution obtenue doit être parfaitement limpide. Au cas où la solution présenterait une opalescence ou un trouble, filtrer rapidement sur papier.
- 5.3. Le cas échéant, corriger les valeurs de base (220-290 nm) avec un solvant dans les deux cuves de quartz (échantillon et référence), puis remplir la cuve en quartz de l'échantillon avec la solution d'essai et mesurer les valeurs d'extinction à 232, 268 ou 270 nm par comparaison avec le solvant servant de référence.

Les valeurs d'extinction enregistrées doivent être comprises dans l'intervalle 0,1 à 0,8 ou dans la plage de linéarité du spectrophotomètre qui doit être vérifiée. Dans le cas contraire, il faut répéter les mesures en utilisant des solutions plus concentrées ou plus diluées, selon le cas.

- 5.4. Après la mesure de l'absorbance à 268 ou 270 nm, mesurer l'absorbance à λ_{\max} , $\lambda_{\max+4}$ et $\lambda_{\max-4}$. Ces valeurs d'absorbance sont utilisées pour déterminer la variation de l'extinction spécifique (ΔK).

Remarque : λ_{\max} est fixé à 268 nm pour l'isooctane utilisé comme solvant et 270 nm pour le cyclohexane.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

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

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c * s}$$

où :

K_{λ} . extinction spécifique à la longueur d'onde λ

¹ En général, une masse de 0,25 à 0,30 g est suffisante pour des mesures d'absorbance d'huiles d'olive vierge et vierge extra à 268 nm et 270 nm. Pour des mesures à 232 nm, 0,05 g d'échantillon est habituellement nécessaire, de sorte que deux solutions distinctes sont généralement préparées. Pour les mesures d'absorbance d'huiles de grignons d'olive, d'huiles d'olive raffinées et d'huiles d'olive frelatées, une plus petite partie de l'échantillon, par exemple 0,1 g, est généralement nécessaire du fait de leur plus forte absorbance.

E_λ : extinction mesurée à la longueur d'onde λ

c : concentration de la solution en g/100 ml

s : épaisseur de la cuve en quartz, en cm.

Les résultats sont exprimés avec deux décimales.

6.2. Variation de l'extinction spécifique (ΔK)

La variation de la valeur absolue de l'extinction spécifique (ΔK) est donnée par la formule :

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

où K_m est l'extinction spécifique à la longueur d'onde correspondant à l'absorption maximale à 270 nm et 268 nm en fonction du solvant utilisé

Les résultats de sont exprimés avec deux décimales.

MARGES DE PRÉCISION DE LA MÉTHODE

Analyse des résultats de l'essai collaboratif

Les marges de précision de la méthode sont indiquées dans les tableaux ci-après.

L'essai collaboratif proposé par le Secrétariat exécutif en 2009 aux laboratoires agréés par le COI à cette date, a été réalisé par 21 laboratoires de 13 pays.

L'essai a porté sur cinq échantillons :

- A : huile d'olive vierge extra
- B : huile d'olive de deuxième centrifugation
- C : huile de grignons d'olive raffinée
- D : huile d'olive vierge + huile de colza + huile de tournesol riche en acide oléique
- E : huile d'olive raffinée + huile de soja raffinée

L'analyse statistique des résultats de l'essai collaboratif réalisée par le Secrétariat exécutif du COI 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. Les résultats sont présentés dans les tableaux A1 à A6.

Le tableau fait état de :

- n** Nombre de laboratoires ayant pris part à l'essai
- outliers** Nombre de laboratoires aux résultats aberrants
- mean** Moyenne des résultats acceptés
- 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 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
- S_r** Écart-type de répétabilité
- CV(r) (%)** 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_R** Écart-type de reproductibilité
- CV_R (%)** Coefficient de variation de reproductibilité ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Tableau A.1 - Extinction UV à 232 nm dans l'isooctane

	A	B	C	D	E
n	21	22	22	22	22
outliers	1	4	4	1	5
mean	1,76	2,10	3,81	3,85	2,82
r	0,072	0,035	0,043	0,101	0,054
S_r	0,026	0,013	0,016	0,036	0,019
RSD_r(%)	1,5	0,6	0,4	0,9	0,7
R	0,216	0,194	0,488	0,582	0,194
S_R	0,077	0,069	0,174	0,211	0,069
RSD_R(%)	4,4	3,3	4,6	5,5	2,5

Tableau A.2 - Extinction UV à 232 nm dans le cyclohexane

	A	B	C	D	E
n	21	21	21	21	21
outliers	3	1	1	0	0
mean	1,76	2,12	3,83	3,86	2,79
r	0,070	0,060	0,119	0,113	0,093
S_r	0,025	0,0216	0,0423	0,0405	0,0332
RSD_r(%)	1,4	1,0	1,1	1,1	1,2
R	0,138	0,204	0,424	0,386	0,279
S_R	0,049	0,073	0,151	0,138	0,100
RSD_R(%)	2,8	3,4	4,0	3,6	3,6

Tableau A.3 - Extinction UV à 268 nm dans l'isooctane

	A	B	C	D	E
n	21	22	22	22	22
outliers	1	4	2	5	2
mean	0,12	0,43	1,14	0,45	0,60
r	0,014	0,014	0,043	0,018	0,018
S_r	0,005	0,005	0,016	0,007	0,007
RSD_r(%)	4,0	1,2	1,4	1,5	1,1
R	0,028	0,045	0,083	0,038	0,094
S_R	0,010	0,016	0,030	0,013	0,034
RSD_R(%)	8,0	3,8	2,6	3,0	5,6

Tableau A.4 - Extinction UV à 270 nm dans le cyclohexane

	A	B	C	D	E
n	21	21	21	21	21
outliers	1	2	1	1	4
mean	0,13	0,43	1,12	0,45	0,59
r	0,014	0,023	0,029	0,033	0,018
S_F	0,005	0,008	0,010	0,012	0,006
RSD_F(%)	4,0	1,9	0,9	2,6	1,1
R	0,031	0,044	0,074	0,04	0,042
S_R	0,011	0,016	0,027	0,014	0,015
RSD_R(%)	8,5	3,7	2,4	3,2	2,5

Tableau A.5 – Variation de l'extinction spécifique ΔK à (270 ± 4) nm dans le cyclohexane

	A	B	C	D	E
n	20	21	21	21	21
outliers	1	1	2	1	3
mean	-0,00	0,00	0,09	0,04	0,05
r	0,002	0,002	0,003	0,003	0,004
S_F	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
RSD_F(%)	28,9	21,6	1,1	2,9	2,9
R	0,008	0,004	0,012	0,007	0,011
S_R	0,003	0,001	0,004	0,003	0,004
RSD_R(%)	147,5	52,0	5,1	7,6	8,1

Tableau A.6 – Variation de l'extinction spécifique ΔK à (278 ± 4) nm dans l'isooctane

	A	B	C	D	E
n	21	21	22	22	22
outliers	0	3	1	2	2
mean	-0,00	0,00	0,08	0,03	0,04
r	0,003	0,001	0,005	0,004	0,002
S_F	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001
RSD_F(%)	36,4	121,1	2,3	4,4	1,7
R	0,011	0,003	0,023	0,011	0,013
S_R	0,004	0,001	0,008	0,004	0,005
RSD_R(%)	148,2	234,8	10,0	12,6	10,6

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: 1994 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