

Norme internationale 6799

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de la composition de la fraction stérolique — Méthode par chromatographie en phase gazeuse

Animal and vegetable fats and oils — Determination of composition of the sterol fraction — Method by gas-liquid chromatography

Première édition — 1983-05-01

CDU 664.3 : 543.544.45 : 547.92

Réf. n° : ISO 6799-1983 (F)

Descripteurs : produit agricole, corps gras animal, corps gras végétal, dosage, stérol, méthode chromatographique en phase gazeuse.

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme internationale ISO 6799 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et a été soumise aux comités membres en avril 1981.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée :

Afrique du Sud, Rép. d'	France	Portugal
Allemagne, R.F.	Hongrie	Roumanie
Australie	Inde	Royaume-Uni
Brésil	Iran	Sri Lanka
Canada	Israël	Tanzanie
Corée, Rép. de	Kenya	Tchécoslovaquie
Dominicaine, République	Malaisie	Thaïlande
Égypte, Rép. arabe d'	Mexico	URSS
Espagne	Nouvelle-Zélande	Yougoslavie
Éthiopie	Philippines	

Les comités membres des pays suivants l'ont désapprouvée pour des raisons techniques :

Pays-Bas
USA

Cette Norme internationale a également été approuvée par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA).

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de la composition de la fraction stérolique — Méthode par chromatographie en phase gazeuse

0 Introduction

Les stérols font partie des constituants caractéristiques des huiles et des graisses. Les graisses animales contiennent toujours du cholestérol, tandis que les huiles et les graisses végétales renferment un mélange de stérols, par exemple de stigmastérol et de β -sitostérol, appelés phytostérols. Cependant, diverses huiles et graisses végétales, notamment l'huile de palme, contiennent un faible pourcentage de cholestérol dans les stérols totaux.

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination, par chromatographie en phase gazeuse sur colonne remplie, de la composition de la fraction stérolique des corps gras d'origines animale et végétale.

Cette méthode est utilisée pour vérifier, soit la pureté d'un corps gras, soit la conformité d'un corps gras à sa dénomination de vente ou à la composition annoncée, et elle est applicable aux corps gras animaux, végétaux ainsi qu'aux mélanges des deux.

Si l'on utilise cette méthode pour détecter la présence de graisses animales dans des graisses végétales, les petites quantités de cholestérol, qui peuvent originellement être présentes dans ces dernières, doivent être prises en considération. Dans ces conditions, il est nécessaire, en plus de l'identification des stérols, de mettre également en œuvre d'autres méthodes d'analyse, par exemple la détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse (voir ISO 5508 et ISO 5509). En pratique, les acides gras ramifiés et les acides gras à nombre impair d'atomes de carbone ne sont présents en quantité appréciable que dans les huiles et graisses animales.

2 Références

ISO 5508, *Corps gras d'origines animale et végétale — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras.*

ISO 5509, *Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation des esters méthyliques d'acides gras.*

3 Principe

Saponification d'une prise d'essai, extraction de l'insaponifiable, puis isolement des stérols de l'insaponifiable par chromatographie en couche mince. Analyse des stérols isolés ou de dérivés préparés à partir de ceux-ci, par chromatographie en phase gazeuse sur colonne remplie.

4 Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

4.1 Réactifs pour la préparation de l'insaponifiable

Ceux-ci seront spécifiés dans une méthode de préparation et de détermination des matières insaponifiables qui fera l'objet de l'ISO 3596.

4.2 Réactifs pour l'isolement des stérols

4.2.1 Éthanol, à 95 % (V/V).

4.2.2 Éther de pétrole, point d'ébullition de 30 à 60 °C.

4.2.3 Acétone.

4.2.4 Chloroforme, ou, si en particulier l'emploi du chloroforme pose des problèmes de sécurité, **tout autre solvant ou mélange de solvants convenable**, par exemple un mélange d'hexane-acétate d'éthyle [80 + 20 (V/V)] ou un mélange de toluène-acétone [95 + 5 (V/V)].

4.2.5 Oxyde diéthylique, exempt de peroxydes et de résidus.

Au lieu d'oxyde diéthylique, on peut utiliser de l'acétate d'éthyle ou du sulfure de carbone pour dissoudre les stérols.

4.2.6 Silice en poudre, avec liant, de qualité pour chromatographie en couche mince¹⁾.

1) Il existe dans le commerce, des gels de silice contenant le révélateur (4.2.7).

4.2.7 Révélateur : rhodamine 6G, solution à 0,5 g/l.

Tout autre produit colorant ou agent de détection, tel que la dichloro-2',7' fluorescéine en solution à 0,5 g/l dans l'éthanol à 95 % (V/V), peut être utilisé à condition de ne pas réagir avec les stérols.

4.2.8 Cholestérol, solution chloroformique à 100 g/l.

4.3 Réactifs pour la préparation des dérivés des stérols

4.3.1 Pyridine, anhydre.

4.3.2 Hexaméthylidisilazane.

4.3.3 Triméthylchlorosilane.

4.3.4 Anhydride acétique.

4.3.5 Hexane.

4.3.6 Hydrogénocarbonate de sodium, solution à 10 g/l.

4.3.7 Acide chlorhydrique, solution à 0,5 mol/l.

4.3.8 Sulfate de sodium, anhydre.

4.4 Réactifs pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse

4.4.1 Gaz vecteur : gaz inerte tel que azote, hélium ou argon.

4.4.2 Stérols purs¹⁾, tels que cholestérol, stigmastérol, brassicastérol, β -sitostérol et campestérol, solutions étalons dans de l'oxyde diéthylique ou tout autre solvant convenable, correspondant à 20 g de stérol par litre.

NOTE — Dans le cas où il est impossible de se procurer les divers stérols purs, et principalement lorsque seulement l'analyse qualitative est effectuée, les solutions de stérols purs peuvent être remplacées par une solution contenant 25 g/l de stérols d'huile de tournesol, 25 g/l de stérols d'huile de colza et 20 g/l de cholestérol.

5 Appareillage

5.1 Appareillage pour la préparation de l'insaponifiable

Celui-ci sera spécifié dans l'ISO 3596 (voir 4.1).

5.2 Appareillage pour l'isolement des stérols

5.2.1 Cuve de développement, en verre, avec couvercle en verre rodé, susceptible de recevoir des plaques de dimensions 200 mm $\times$ 200 mm.

5.2.2 Étaleur et socle, pour la préparation des plaques.

5.2.3 Plaques en verre, de dimensions 200 mm $\times$ 200 mm.

5.2.4 Micropipettes ou microseringues, permettant de délivrer des gouttelettes de 0,3 à 0,4 μ l. Un appareil automatique pour le dépôt des gouttelettes peut être utilisé.

5.2.5 Appareil pour pulvériser le révélateur sur les plaques.

5.2.6 Microspatule.

5.2.7 Étuve, réglable à 103 ± 2 °C.

5.2.8 Bain d'eau bouillante.

5.2.9 Filtre à plis, de diamètre 55 mm, pour la rétention des particules fines.

5.2.10 Fioles coniques, de capacité 25 ml.

5.2.11 Fiole conique, de capacité 250 ml.

5.2.12 Réfrigérant à reflux, s'adaptant aux fioles coniques de 25 ml (5.2.10).

5.2.13 Dessiccateur, contenant un déshydratant efficace.

5.2.14 Lampe à ultraviolet.

5.3 Appareillage pour la préparation des dérivés des stérols (éventuellement)

5.3.1 Tube à réaction, conique intérieurement, de capacité 5 ml, muni d'un bouchon à vis ou **tube à hémolyse**, de capacité 5 ml.

5.3.2 Tube à hémolyse, de capacité 10 ml.

5.3.3 Micropipettes graduées.

1) La plupart des stérols purs ne sont pas commercialisés.

5.4 Appareillage pour l'analyse des stérols

5.4.1 Chromatographe en phase gazeuse, avec détecteur à ionisation de flamme et enregistreur, comprenant une colonne en verre, de 180 à 200 cm de long, et de 2 à 4 mm de diamètre, remplie de 2 à 5 % de méthylpolysiloxanes¹⁾ ou de méthylphénylpolysiloxanes²⁾ sur terre de diatomées de granulométrie 150 à 180 µm ou 120 à 150 µm³⁾, lavée aux acides et silanisée.

NOTES

1 Étant donné que les stérols ont tendance à se décomposer à haute température lorsqu'ils sont en contact avec des métaux (l'argent excepté), il est recommandé d'employer un système entièrement en verre. Toutefois, on peut utiliser une colonne en acier inoxydable, à condition de tester l'efficacité et la résolution de celle-ci avec un mélange connu de stérols, et de vérifier l'absence de décomposition ou d'adsorption des stérols présents en faibles quantités.

2 La séparation des stérols dépend, en grande partie, de la phase stationnaire utilisée (voir 6.4.3).

6 Mode opératoire

6.1 Prise d'essai et préparation de l'insaponifiable

Peser⁴⁾, à 0,01 g près, 5 g de l'échantillon pour essai et extraire l'insaponifiable en éliminant le solvant jusqu'à obtention d'environ 1 ml de solution.

NOTES

1 Une méthode d'extraction de l'insaponifiable sera spécifiée dans l'ISO 3596.

2 Pour les huiles à faible teneur en stérols (inférieure à 0,1 %), comme l'huile de palme par exemple, il est conseillé d'augmenter la prise d'essai afin de disposer d'au moins 5 mg de stérols; modifier en conséquence les quantités de réactifs.

3 Si l'on envisage une détermination quantitative, il est nécessaire de sécher l'insaponifiable en opérant à 50 °C maximum sous pression réduite, afin d'éviter toute détérioration oxydative indésirable, puis de le peser et le dissoudre dans 0,5 à 1 ml de solvant (4.2.4).

6.2 Isolement des stérols par chromatographie sur couche mince

6.2.1 Préparation des plaques⁵⁾

Nettoyer soigneusement les plaques en verre (5.2.3) avec de l'éthanol (4.2.1), de l'éther de pétrole (4.2.2) et de l'acétone (4.2.3) jusqu'à élimination totale des matières grasses.

Dans la fiole conique de 250 ml (5.2.11), mettre 30 g de silice (4.2.6). Ajouter 60 ml d'eau. Boucher et agiter énergiquement

pendant 1 min. Introduire aussitôt la pâte dans l'étaleur (5.2.2). Étendre en couche de 0,25 mm d'épaisseur sur les plaques propres.

Laisser sécher les plaques pendant 15 min à l'air, puis dans l'étuve (5.2.7) réglée à 103 ± 2 °C pendant 1 h. Laisser refroidir avant l'emploi les plaques dans un dessiccateur (5.2.13) jusqu'à température ambiante.

6.2.2 Préparation de la cuve

Introduire une quantité suffisante de solvant (4.2.4) dans la cuve à développement (5.2.1) et mettre le couvercle. Attendre quelques heures afin d'obtenir l'équilibre liquide-vapeur; cet état peut être atteint plus rapidement en plaçant une feuille de papier filtre couvrant trois des faces internes de la cuve et plongeant dans le solvant de développement.

6.2.3 Isolement des stérols

À l'aide d'une micropipette ou microseringue (5.2.4), déposer sur une plaque préparée (voir 6.2.1) à 20 mm d'un des bords, et en une bande continue de gouttelettes aussi fines que possible, 50 à 60 µl de la solution obtenue en 6.1, en laissant inutilisée une largeur de 25 mm sur les côtés droit et gauche de la plaque.

Déposer 0,3 à 0,4 µl de la solution de cholestérol (4.2.8) à 10 mm du bord gauche et à 10 mm du bord droit de la plaque.

Introduire immédiatement la plaque dans la cuve de développement (6.2.2), mettre le couvercle et développer la plaque jusqu'à ce que le front du solvant arrive à environ 10 mm du bord supérieur. Retirer la plaque de la cuve et laisser le solvant s'évaporer à la température du laboratoire, de préférence sous une hotte.

Pulvériser à l'aide de l'appareil (5.2.5) la solution appropriée de révélateur, par exemple une solution de rhodamine 6G (4.2.7) et examiner le chromatogramme ainsi obtenu, en lumière ultraviolette. Localiser la position de la fraction stérolique à l'aide des deux taches de référence de cholestérol et en marquer la position avec une aiguille.

NOTE — La tache de la fraction stérolique doit être complètement séparée des taches des autres constituants.

Récupérer la silice contenant les taches de stérols avec une microspatule (5.2.6) ou tout autre moyen convenable. Transférer la silice dans une fiole conique de 25 ml (5.2.10), ajouter 5 ml de chloroforme (4.2.4) ou d'oxyde diéthylique (4.2.5) (voir note ci-dessous), adapter un réfrigérant à reflux (5.2.12) à la fiole et porter à ébullition douce sur un bain d'eau (5.2.8) pendant 15 min.

1) SE 30, JXR ou OV 1 conviennent.

2) OV 17 convient.

3) 80 à 100 mesh ou 100 à 120 mesh.

4) Une pesée très précise n'est pas nécessaire si l'on envisage uniquement une détermination qualitative.

5) On peut se procurer dans le commerce des plaques toutes préparées.

Laisser refroidir et filtrer sur un filtre à plis (5.2.9) dans une fiole conique de 25 ml (5.2.10). Reprendre la silice déposée sur le filtre et la traiter à nouveau à l'ébullition avec 5 ml de chloroforme ou d'oxyde diéthylique. Répéter trois fois ce traitement.

NOTE — À la place de chloroforme, de l'oxyde diéthylique peut être utilisé avec certains avantages, par exemple la rhodamine 6G est soluble dans le chloroforme et insoluble dans l'oxyde diéthylique.

Réunir les filtrats et éliminer le solvant sous un léger courant d'azote. Dissoudre le résidu dans la quantité minimale (en général moins de 1 ml) d'oxyde diéthylique (4.2.5) ou de chloroforme (4.2.4).

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des stérols peut alors être effectuée :

- a) directement avec les stérols libres en solution;
- b) avec les dérivés des stérols [silyléthers ou acétates (voir 6.3)]. Ces composés donnent avec certaines phases fixes moins de traînées que les stérols libres.

6.3 Préparation de dérivés des stérols (éventuellement)

Préparer les silyléthers (6.3.1) ou, à défaut, les acétates (6.3.2). Une fois ceux-ci préparés, les chromatographier immédiatement.

6.3.1 Formation des silyléthers

Introduire, dans le tube à réaction ou le tube à hémolyse de 5 ml (5.3.1), quelques milligrammes de stérols, ajouter dans l'ordre 0,5 ml de pyridine (4.3.1), 0,1 ml d'hexaméthylidisilazane (4.3.2) et 0,04 ml de triméthylchlorosilane (4.3.3). Laisser reposer 5 min. Injecter entre 0,5 et 1,0 µl de surnageant.

6.3.2 Microacétylation des stérols

Placer quelques milligrammes de stérols dans le tube à hémolyse de 10 ml (5.3.2). Ajouter 0,1 ml d'anhydride acétique (4.3.4), puis 0,1 ml de pyridine (4.3.1). Maintenir pendant 1 h à 70 °C. Verser 2 ml d'eau glacée et 5 ml d'hexane (4.3.5). Agiter énergiquement, puis éliminer l'eau (en utilisant une petite ampoule à décanter ou une pipette). Laver successivement avec 5 ml de la solution d'hydrogencarbonate de sodium (4.3.6), puis avec 5 ml de la solution d'acide chlorhydrique (4.3.7), enfin avec 5 ml d'eau. Sécher l'extrait sur sulfate de sodium (4.3.8) et filtrer.

6.4 Analyse par chromatographie en phase gazeuse des stérols isolés ou de leurs dérivés

6.4.1 Réglage de l'appareil

6.4.1.1 Dispositif d'injection

- Température : 20 à 30 °C au-dessus de celle de la colonne.

6.4.1.2 Four et colonne

- Température : 230 à 240 °C.
- Débit du gaz vecteur : 30 à 50 ml/min.

Avant la première utilisation, conditionner les colonnes remplies pendant 48 h à 250 °C en présence du gaz vecteur.

La résolution des pics du campestérol et du stigmastérol doit être supérieure à 1,0. Dans le cas contraire, la colonne ne doit pas être utilisée pour la détermination des stérols.

6.4.2 Essai

Injecter un volume approprié de chacune des solutions étalons (4.4.2), afin de déterminer la distance (ou le temps) de rétention propre à chaque stérol.

Injecter ensuite dans l'appareil la quantité appropriée du mélange de stérols isolés (6.2.3) ou de leurs dérivés (6.3.1 ou 6.3.2).

6.4.3 Examen des chromatogrammes

Identifier les stérols présents en déterminant les distances (ou temps) de rétention relatifs.

Les stérols séparables, en colonne remplie, dépendent du choix de la phase stationnaire. C'est ainsi que si l'on utilise comme phase stationnaire les méthylphénylpolsiloxanes, on peut séparer le β -sitostérol du Δ -5-avenastérol et le Δ -7-stigmastérol du Δ -7-avenastérol.

Dans ces conditions opératoires, en utilisant comme phase stationnaire les méthylphénylpolsiloxanes (OV 17) ou méthylpolsiloxanes (SE 30), à titre indicatif, les temps de rétention relatifs des stérols libres (l'origine étant le pic de l'air) par rapport au cholestérol, sont donnés dans le tableau suivant.

Stérol	Phase stationnaire	
	SE 30	OV 17
Cholestérol	1,00	1,00
Brassicatérol	1,11	1,13
Campestérol	1,26	1,33
Stigmastérol	1,36	1,45
β -Sitostérol	1,56	1,66
Δ -5-Avenastérol	1,56	1,86
Δ -7-Stigmastérol	1,76	1,96
Δ -7-Avenastérol	1,76	2,18

7 Expression des résultats

7.1 La présente méthode permet de déterminer la composition des stérols pour une phase stationnaire donnée, moyennant certaines restrictions :

- a) la réponse de chaque stérol est fonction du modèle de détecteur utilisé;
- b) l'interprétation quantitative précise des chromatogrammes est possible seulement si les stérols individuels utilisés