

NORME INTERNATIONALE

**ISO
6799**

Deuxième édition
1991-12-15

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Animal and vegetable fats and oils — Determination of composition of
the sterol fraction — Method using gas chromatography*

ISO 6799:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8b0844a4-82fe-4c15-8dd6-a73af6bd3b8c/iso-6799-1991>



Numéro de référence
ISO 6799:1991(F)

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 en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 6799 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 6799:1983), dont elle constitue une révision technique.

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

Introduction

Les stérols font partie des constituants caractéristiques des corps gras. 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, certaines huiles et graisses végétales, par exemple l'huile de colza, de maïs et de palme, contiennent un faible pourcentage de cholestérol dans les stérols totaux.

Les résultats de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale peuvent être utilisés pour vérifier la pureté d'un corps gras, la conformité d'un corps gras à sa dénomination de vente ou à la composition annoncée, ou pour contrôler les propriétés nutritionnelles d'un corps gras alimentaire.

Pour déceler 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 corps gras d'origine animale.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6799:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8b0844a4-82fe-4c15-8dd6-a73af6bd3b8c/iso-6799-1991>

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

1 Domaine d'application

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

Les désoxystérols sont déterminés mais les stérols substitués (c'est-à-dire méthyle et diméthyle) peuvent interférer et il faut y prêter attention lors de l'interprétation des résultats.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 661:1989, *Corps gras d'origines animale et végétale — Préparation de l'échantillon pour essai*.

ISO 3596-1:1988, *Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de la teneur en matières insaponifiables — Partie 1: Méthode par extraction à l'oxyde diéthylique (méthode de référence)*.

ISO 3596-2:1988, *Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination de la teneur en matières*

insaponifiables — Partie 2: Méthode rapide par extraction à l'hexane.

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*.

ISO 5508:1990, *Corps gras d'origines animale et végétale — Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras*.

3 Principe

Saponification d'une prise d'essai, extraction de l'insaponifiable et 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 ou capillaire.

4 Réactifs

Les composés dangereux sont marqués d'un astérisque.

Sauf indication différente, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau conforme au grade 3 de l'ISO 3696.

4.1 Réactifs pour la préparation de l'insaponifiable

Voir l'ISO 3596-1 ou l'ISO 3596-2.

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 °C à 60 °C.

4.2.3 Acétone

4.2.4 Solvant de développement, tel que du chloroforme* ou un mélange d'hexane-acétate d'éthyle [80 + 20 (V/V)] ou un mélange de toluène*-acétone [95 + 5 (V/V)].

4.2.5 Acétate d'éthyle ou **oxyde diéthylique**, exempt de peroxydes et de résidus.

4.2.6 Silice en poudre, avec liant, de qualité pour chromatographie en couche mince¹⁾ (si nécessaire, voir 8.2.1).

4.2.7 Révélateur, par exemple 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 <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8b0844a4-82fe-4c15-8dd6-a73af6bd3b85/iso-6799-1991>

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 $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$.

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, argon ou hydrogène, etc.) soigneusement desséché et contenant moins de 10 mg/kg d'oxygène.

NOTE 1 L'hydrogène que l'on utilise seulement avec une colonne capillaire permet de doubler la vitesse

d'analyse mais présente des dangers. Il existe cependant des dispositifs de sécurité.

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

NOTE 2 La plupart des stérols purs ne sont pas commercialisés. Le Bureau Communautaire de Références (BCR) prépare des stérols étalons, par exemple RM162 (maïs et soja en masses égales).

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. Les stérols de ces solutions doivent être préparés comme décrit en 8.1 et 8.2.

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment

5.1 Appareillage pour la préparation de l'insaponifiable

Voir l'ISO 3596-1 ou l'ISO 3596-2.

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 × 200 mm.

5.2.2 Étaleur et socle, pour la préparation des plaques (si nécessaire, voir 8.2.1).

5.2.3 Plaques prêtes à l'emploi dimensions 200 mm × 200 mm, ou **plaques en verre**, de mêmes dimensions.

5.2.4 Micropipettes ou **microseringues**, permettant de délivrer des gouttelettes de 0,3 µl à 0,4 µl. 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 $103 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.8 Bain d'eau bouillante

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

5.2.9 Papier-filtre, de diamètre 55 mm, plissé pour la rétention des particules fines.

5.2.10 Fioles coniques, de 25 ml de capacité.

5.2.11 Fiole conique, de 250 ml de capacité.

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 5 ml de capacité, muni d'un bouchon à vis doublé, de préférence, de polytétrafluoroéthylène (PTFE), ou **tube à hémolyse**, de 5 ml de capacité.

5.3.2 Tube à hémolyse, de 10 ml de capacité.

5.3.3 Micropipettes graduées

5.4 Appareillage pour l'analyse des stérols

5.4.1 Chromatographe en phase gazeuse, avec détecteur à ionisation de flamme et enregistreur, équipé d'une colonne remplie (5.4.2) ou d'une colonne capillaire (5.4.3), et d'un injecteur approprié tel qu'un injecteur à division.

5.4.2 Colonne remplie, en verre, de 180 cm à 200 cm de long, de 2 mm à 4 mm de diamètre, silanisée et imprégnée de 2 % (*m/m*) à 5 % (*m/m*) de méthylpolysiloxanes²⁾ ou de méthylphénylpoly-siloxanes³⁾ sur terre de diatomées de granulométrie 150 µm à 180 µm ou 120 µm à 150 µm⁴⁾.

NOTES

3 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 dé-

composition ou de rétention des stérols présents en faibles quantités.

4 La séparation des stérols dépend, en grande partie, de la phase stationnaire utilisée (voir 8.4.1.3).

5.4.3 Colonne capillaire, de 10 m à 25 m de long, 0,2 mm à 0,5 mm, de diamètre intérieur, désactivée par silanisation, puis imprégnée de méthylpolysiloxanes²⁾ ou de méthylphénylpoly-siloxanes³⁾ ou de toute autre phase appropriée.

NOTES

5 Voir tableau 2 pour les temps de rétention relatifs par rapport au cholestérol.

6 Voir note 4 en 5.4.2.

6 Échantillonnage

L'échantillonnage doit avoir été effectué conformément à l'ISO 5555.

7 Préparation de l'échantillon pour l'essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 661.

8 Mode opératoire

AVERTISSEMENT — Éviter toute exposition prolongée à la pyridine ou au chloroforme, par exemple, en effectuant toutes les opérations, dans la mesure du possible, sous une hotte d'aspiration.

8.1 Préparation de l'insaponifiable

En utilisant 5 g ± 0,2 g d'échantillon pour l'essai (voir article 7), préparer l'insaponifiable selon l'ISO 3596-1 ou l'ISO 3596-2, en éliminant le solvant jusqu'à obtention d'environ 1 ml de solution.

NOTES

7 Pour les corps gras à faible teneur en stérols [approximativement inférieure à 0,1 % (*m/m*)], 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.

8 On peut obtenir une meilleure séparation en 8.2 si le solvant est complètement évaporé et si le résidu se dissout dans l'hexane.

2) SE 30, JXR ou OV 1 sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif de ces produits.

3) OV 17 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif de ce produit.

4) 80 mesh à 100 mesh ou 100 mesh à 120 mesh.

8.2 Isolement des stérols par chromatographie sur couche mince

8.2.1 Préparation des plaques

Si des plaques prêtes à l'emploi ne sont pas disponibles, les préparer comme suit. 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.

Pour la préparation de cinq plaques, mettre dans la fiole conique de 250 ml (5.2.11), 30 g de silice en poudre (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 °C pendant 1 h. Laisser refroidir avant l'emploi les plaques dans un dessiccateur (5.2.13) jusqu'à température ambiante.

8.2.2 Isolement des stérols

À l'aide d'une micropipette ou microseringue (5.2.4), déposer sur une plaque préparée (voir 8.2.1) à 20 mm de la base, et en une bande continue de gouttelettes aussi fines que possible, 50 µl à 60 µl de la solution obtenue en 8.1, en laissant inutilisée une largeur de 25 mm sur les côtés droit et gauche de la plaque.

Déposer 0,3 µl 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 une quantité suffisante de solvant (4.2.4) dans la cuve de développement (5.2.1) et y placer immédiatement la plaque. 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 du révélateur, par exemple une solution de rhodamine 6G (4.2.7) et examiner le chromatogramme ainsi obtenu, en lumière ultraviolette. Identifier 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 9 La tache de la fraction stérolique devrait être complètement séparée des taches des autres constituants, et notamment de celles des méthyle et diméthyle stérols.

8.2.3 Récupération des stérols

Récupérer la silice contenant la fraction stérolique 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 solvant de développement (4.2.4) ou d'acétate d'éthyle ou d'oxyde diéthylique (4.2.5) (voir note 9), 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.

Laisser refroidir et filtrer sur un papier-filtre (5.2.9) dans une fiole conique de 25 ml (5.2.10). En ramenant la silice déposée sur le papier filtre dans la fiole utilisée pour l'extraction, répéter l'extraction et la filtration. Effectuer encore deux fois l'extraction et la filtration.

NOTE 10 L'utilisation d'oxyde diéthylique présente certains avantages par rapport au chloroforme, un de ces avantages étant que la rhodamine 6G est insoluble dans l'oxyde diéthylique et soluble dans le chloroforme.

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'acétate d'éthyle ou d'oxyde diéthylique (4.2.5) ou de solvant de développement (4.2.4).

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

- a) directement avec les stérols libres en solution, sauf si l'on utilise des colonnes capillaires polaires;
- b) avec les dérivés des stérols [silyéthers ou acétates (voir 8.3)]. Sur certaines phases fixes, ces composés donnent des pics présentant moins de traînées que les stérols libres.

8.3 Préparation de dérivés des stérols (éventuellement)

Préparer les silyéthers selon le mode opératoire décrit en 8.3.1 ou, à défaut, les acétates selon le mode opératoire décrit en 8.3.2.

Une fois ceux-ci préparés, les chromatographier immédiatement.

Des dérivés de stérols peuvent aussi être préparés en utilisant le *N*-méthyle-*N*-triméthylsilylheptafluorobutyramide (MSHFBA), le *N*-méthyle-*N*-triméthylsilyltrifluoroacétamide (MSTFA) ou le *N*-triméthylsilylimidazole (MSI) [disponible sous la désignation TriSil® «Z»⁵⁾].

8.3.1 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'hexaméthylsilazane (4.3.2) et 0,04 ml de triméthylchlorosilane (4.3.3). Laisser reposer 5 min. Utiliser le surnageant pour l'injection.

NOTE 11 Pour les analyses en série, il est recommandé de mélanger les réactifs à l'avance, d'évaporer à sec le mélange silylant, puis de le dissoudre dans l'oxyde diéthylique ou l'hexane.

8.3.2 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.

8.4 Analyse par chromatographie en phase gazeuse des stérols libres ou de leurs dérivés

NOTE 12 L'utilisation de colonnes capillaires apolaires est recommandée pour l'analyse des stérols libres.

8.4.1 Chromatographie sur colonne remplie

8.4.1.1 Réglage de l'appareil

8.4.1.1.1 Dispositif d'injection et de détection

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

8.4.1.1.2 Four et colonne

— Température: 230 °C à 240 °C.

— Débit du gaz vecteur (4.4.1): 30 ml/min à 50 ml/min.

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

Déterminer la résolution de la colonne conformément à l'ISO 5508.

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.

8.4.1.2 Essai

Injecter un volume approprié de chacune des solutions étalons (4.4.2), par exemple de 0,5 µl à 1,0 µl, afin de déterminer le temps (ou la distance) de rétention propre à chaque stérol.

Injecter ensuite dans l'appareil la quantité appropriée, par exemple de 0,5 µl à 1,0 µl du mélange de stérols isolés (8.2.3) ou de leurs dérivés (8.3.1 ou 8.3.2).

8.4.1.3 Examen des chromatogrammes

Identifier les stérols présents en déterminant les temps (ou distances) 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-avénastérol et le Δ -7-stigmastérol du Δ -7-avénastérol.

NOTE 13 Dans ces conditions opératoires, en utilisant comme phase stationnaire les méthylphénylpolsiloxanes (OV 17) ou méthylpolsiloxanes (SE 30) les temps de rétention relatifs des stérols libres (l'origine étant le pic du solvant) par rapport au cholestérol, sont donnés dans le tableau 1.

Tableau 1 — Temps de rétention relatifs pour les colonnes remplies

Stérol	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-Avénaatérol	1,56	1,86
Δ -7-Stigmastérol	1,76	1,96
Δ -7-Avénaatérol	1,76	2,18

5) TriSil® «Z» est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.