

Norme internationale



7609

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

Huiles essentielles — Analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire — Méthode générale

Essential oils — Analysis by gas chromatography on capillary columns — General method

Première édition — 1985-12-01

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7609:1985

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/72dcee63-93a8-488f-9b52-c2063488d0d2/iso-7609-1985>

CDU 665.5 : 543.544

Réf. n° : ISO 7609-1985 (F)

Descripteurs : huile essentielle, analyse chimique, méthode chromatographique, chromatographie 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 créé à cet effet. 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. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 7609 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 54, *Huiles essentielles*.

ISO 7609:1985

L'attention des utilisateurs est attirée sur le fait que toutes les Normes internationales sont de temps en temps soumises à révision et que toute référence faite à une autre Norme internationale dans le présent document implique qu'il s'agit, sauf indication contraire, de la dernière édition.

Huiles essentielles — Analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire — Méthode générale

0 Introduction

La description des méthodes d'analyse par chromatographie étant longue, il a été estimé utile d'établir, d'une part, des normes générales donnant en détail tous les paramètres répétitifs: appareillage, produits, méthodes, formules de calcul, etc., et, d'autre part, des normes constituant des fiches d'analyse abrégées relatives au dosage des composés dans les huiles essentielles, et ne reprenant que les conditions opératoires spécifiques au dosage concerné.

Ces fiches se référeront, selon le cas, soit à la présente Norme internationale pour les analyses effectuées par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, soit à l'ISO 7359 pour les analyses effectuées sur colonne remplie.

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode générale d'analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, dans le but de doser un composé spécifique et/ou de rechercher un profil caractéristique.

2 Références

ISO 356, *Huiles essentielles — Préparation de l'échantillon pour essai*.

ISO 7359, *Huiles essentielles — Analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne remplie — Méthode générale*.

3 Principe

Analyse par chromatographie en phase gazeuse, dans des conditions spécifiées, d'une petite quantité¹⁾ d'huile essentielle sur une colonne de faible diamètre et de longueur importante, la paroi intérieure de cette colonne étant préalablement enduite, soit directement d'une phase stationnaire déterminée, soit d'un support imprégné (colonne enduite intérieurement d'un support imprégné).

Localisation éventuelle des différents composés par mesure de leurs indices de rétention.

Détermination quantitative des composés spécifiques par mesure de l'aire de leurs pics.

4 Réactifs et produits

Au cours de l'analyse, sauf indications différentes, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et des produits récemment distillés.

4.1 Gaz vecteur: hydrogène²⁾, hélium ou azote, selon le type de détecteur que l'on utilise. Lorsqu'on utilise des détecteurs exigeant l'emploi de gaz vecteurs autres que ceux indiqués ci-dessus, le gaz vecteur à utiliser devra être indiqué.

4.1.1 Gaz auxiliaires: tous gaz utiles selon le détecteur utilisé. Pour un détecteur à ionisation de flamme, air et hydrogène de haute pureté.

4.2 Produit pour le contrôle de l'inertie chimique de la colonne: acétate de linalyle, de pureté minimale 98 %.

4.3 Produits pour le contrôle de l'efficacité de la colonne.³⁾

4.3.1 Linalol, de pureté minimale 99 % déterminée par chromatographie.

4.3.2 Méthane, de pureté minimale 99 % déterminée par chromatographie.

4.4 Substance de référence, correspondant au composé à doser ou à localiser. Elle sera indiquée dans chaque Norme internationale particulière.

4.5 Étalon interne.

L'étalon interne sera précisé dans chaque Norme internationale particulière, et devra éluer aussi près que possible du composé

1) Prendre soin que la prise d'essai injectée ne risque pas de saturer la colonne.

2) Se conformer strictement aux consignes de sécurité en cas d'utilisation de ce gaz.

3) D'autres produits peuvent être utilisés pour déterminer l'efficacité de la colonne; ils seront précisés dans chaque Norme internationale particulière.

à doser et ne se superposer à aucun des pics correspondant aux composés de l'huile essentielle.

4.6 Alcanes normaux, de pureté minimale 95 % déterminée par chromatographie. La gamme des alcanes normaux à utiliser dans une certaine Norme internationale dépend de l'indice de rétention des composés concernés dans les conditions de l'essai.

NOTE — Les alcanes normaux sont utilisés uniquement si l'on désire déterminer les indices de rétention.

4.7 Mélange d'essai.

Préparer un mélange contenant des proportions à peu près égales de

- limonène,
- acétophénone,
- linalol,
- acétate de linalyle,
- naphtalène,
- alcool cinnamique.

Tous ces réactifs doivent être de pureté minimale 95 % déterminée par chromatographie.

NOTE — D'autres produits peuvent être utilisés; ils seront précisés dans chaque Norme internationale particulière.

5 Appareillage

5.1 Chromatographe, équipé d'un injecteur spécial pour colonnes capillaires, permettant l'injection de quantités de l'ordre de 10^{-6} g, d'un détecteur approprié et d'un programmeur de température. Les systèmes d'injection et de détection doivent être munis de dispositifs permettant le réglage indépendant de leurs températures respectives.

5.2 Colonne, en matériau inerte (par exemple verre, acier inoxydable, silice ou silice fondue), d'un diamètre intérieur compris entre 0,2 et 0,5 mm, et d'une longueur de 15 à 100 m.

La nature de la phase stationnaire sera précisée dans chaque Norme internationale particulière. Actuellement, les phases stationnaires les plus couramment utilisées sont: les polysiloxanes méthylés ou phénylés ou polyéthylènes glycols dont les fonctions alcool terminales peuvent être libres ou estérifiées.

5.3 Enregistreur et intégrateur électronique, dont les performances sont compatibles avec l'ensemble de l'appareillage.

6 Préparation de l'échantillon pour essai

Voir ISO 356.

Si l'échantillon pour essai à injecter doit subir une préparation spéciale, celle-ci sera indiquée dans la Norme internationale particulière.

7 Conditions opératoires

7.1 Températures

Les températures du four, de l'injecteur et du détecteur seront précisées dans chaque Norme internationale particulière.

7.2 Débit du gaz vecteur

Régler le débit de manière à obtenir l'efficacité nécessaire (voir 8.2).

7.3 Débit des gaz auxiliaires

Se référer aux instructions du constructeur de l'appareil, de manière à respecter les conditions optimales de réponse du détecteur.

8 Performances de la colonne

8.1 Test d'inertie chimique

Injecter une quantité d'acétate de linalyle dans les conditions d'analyse (voir 7.1).

On doit obtenir un seul pic (dans la limite de pureté définie).

8.2 Efficacité de la colonne

Déterminer l'efficacité de la colonne sur le pic du linalol, à température isotherme de 130 °C. Déterminer le nombre de plateaux effectifs, N , qui doit être au moins égal à 25 000, à l'aide de l'une ou l'autre des formules suivantes:

Formule n° 1 (voir figure 1)

$$N = 16 \left(\frac{d'_r}{\omega} \right)^2$$

Formule n° 2

$$N = 5,54 \left(\frac{d'_r}{b} \right)^2$$

où

d'_r est la distance de rétention réduite, en unités de longueur (distance de rétention du pic du linalol moins la distance de rétention du pic de l'air ou du pic du méthane à 130 °C, assimilable au pic de l'air);

ω est la distance, en mêmes unités de longueur que la distance de rétention, comprise entre les deux points d'intersection de la ligne de base avec les deux tangentes aux points d'inflexion du pic du linalol;

b est la largeur, en millimètres, du pic du composé spécifié (linalol) à mi-hauteur du pic.

La vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur doit être telle que ω soit au moins égale à 10 mm, de façon à avoir une précision suffisante.

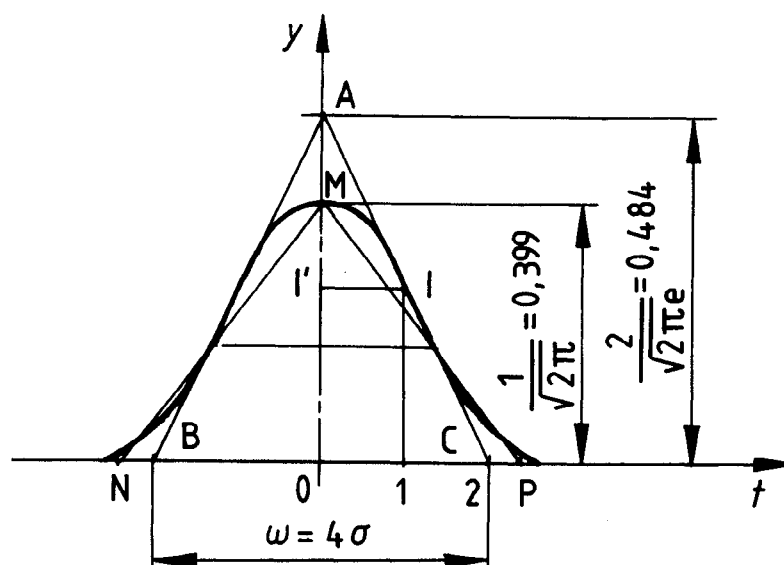


Figure 1

La vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur doit être telle que b soit au moins égale à 5 mm, de façon à avoir une précision suffisante.

STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

8.3 Résolution et séparation

Pour déterminer la résolution et/ou la séparation, injecter une quantité du mélange d'essai (4.7) dans les conditions de l'essai.

ISO 7609:1985

standards/sist/72dcee63-93a8-4887-9b32-100000000000/iso-7609-1985

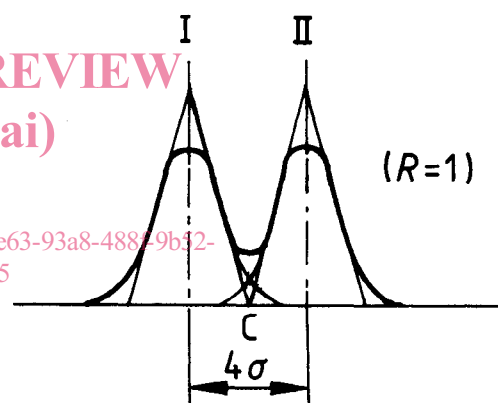


Figure 2

8.3.1 Détermination de la résolution

Calculer le facteur de résolution, R , de deux pics avoisinants I et II, à l'aide de la formule

$$R = 2 \frac{d_{r(II)} - d_{r(I)}}{\omega_{(I)} + \omega_{(II)}}$$

où

$d_{r(I)}$ est la distance de rétention du pic I;

$d_{r(II)}$ est la distance de rétention du pic II;

$\omega_{(I)}$ est la largeur de la base du pic I;

$\omega_{(II)}$ est la largeur de la base du pic II;

Si $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, calculer R à l'aide de la formule

$$R = \frac{d_{r(II)} - d_{r(I)}}{\omega} = \frac{d_{r(II)} - d_{r(I)}}{4\sigma}$$

où σ est l'écart-type (voir figure 1).

Si la distance entre les deux pics, $d_{r(II)} - d_{r(I)}$, est égale à 4σ , le facteur de résolution $R = 1$.

Si les deux pics ne sont pas complètement séparés, les tangentes aux points d'inflexion des deux pics se croisent au point C. Pour séparer complètement les deux pics la distance entre les deux pics doit être égale à

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6\sigma$$

d'où $R = 1,5$ (voir figure 3).

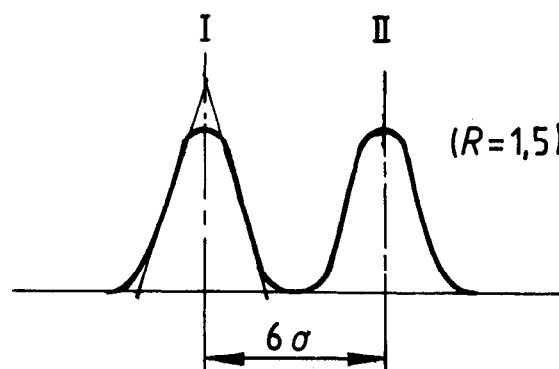


Figure 3

8.3.2 Détermination de la séparation (voir figure 4)

Tracer une droite passant par les sommets des pics concernés. À partir de la ligne de base, tracer une perpendiculaire passant par le minimum entre les deux pics. Mesurer la distance, h , sur cette perpendiculaire, entre la ligne de base et son point d'intersection avec la droite passant par les sommets des pics concernés.

Mesurer également la distance, v , sur la perpendiculaire entre la ligne de base et le point minimal entre les deux pics.

Calculer la séparation, p , exprimée en pourcentage, à l'aide de la formule

$$p = \frac{100 (h - v)}{h}$$

8.3.3 Contrôle de la séparation en température programmée

Travailler dans les conditions suivantes:

- colonne de diméthylpolysiloxane ou de polyéthylène glycol;
- température programmée de 80 à 220 °C, à raison de 2 ou 3 °C/min.

Le débit du gaz vecteur doit permettre l'élution de tous les composants du mélange d'essai (4.7) et des alcanes normaux (4.6) nécessaires pour la détermination de leurs indices de rétention avant la fin de la programmation de température.

8.3.3.1 Injecter une quantité appropriée du mélange d'essai (4.7).

Sur le chromatogramme obtenu:

- a) sur les colonnes de diméthylpolysiloxane, les pics du limonène et de l'acétophénone doivent être séparés à 95 % au moins (voir 8.3.2);

- b) sur les colonnes de polyéthylène glycol ($M_r = 20\ 000$), les pics du linalol et de l'acétate de linalyle doivent être séparés à 95 % au moins (voir 8.3.2).

Pour les autres remplissages éventuellement indiqués dans la méthode d'analyse, les exigences seront précisées dans celle-ci.

8.3.3.2 Injecter une quantité appropriée du mélange d'essai (4.7) et calculer les indices de rétention (voir chapitre 9) des constituants du mélange d'essai.

Sur les colonnes de diméthylpolysiloxane, utiliser les alcanes C_{10} à C_{16} .

Sur les colonnes de polyéthylène glycol ($M_r = 20\ 000$), utiliser les alcanes C_{11} à C_{24} .

Les indices de rétention calculés indiquent la « polarité » de la colonne par rapport aux diverses caractéristiques structurales des constituants analysés.

Les résultats obtenus sur des colonnes différentes avec le même remplissage nominal sont comparables si les indices de rétention des constituants du mélange d'essai ne diffèrent que légèrement sur les différentes colonnes.¹⁾

9 Détermination des indices de rétention

S'il faut déterminer les indices relatifs de rétention, préparer un mélange de la prise d'essai avec des alcanes normaux comprenant le n -pentane. Choisir les alcanes normaux selon la gamme d'indices de rétention attendue. Après stabilisation de la température de la colonne, injecter une quantité appropriée de ce mélange, et effectuer l'analyse dans les conditions précisées en 10.1.1.

On obtient le chromatogramme « B ».

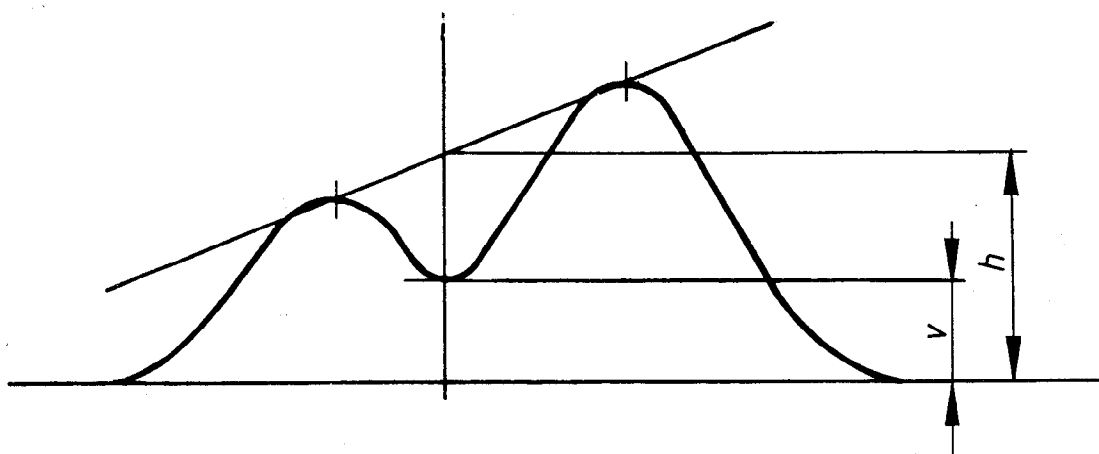


Figure 4

1) À l'avenir, les limites de ces différences seront précisées.

9.1 Mesure des indices de rétention

Comparer les chromatogrammes «A» (voir 10.1.1) et «B» (voir chapitre 9) et repérer dans le chromatogramme «B» les pics correspondant aux alcanes normaux.

Sur le chromatogramme «B», effectuer les mesures comme suit.

9.1.1 Conditions isothermes

Calculer la différence des distances de rétention entre le sommet du pic considéré et le sommet du pic du méthane. Soit d'_x cette différence, en millimètres.

Calculer la différence des distances de rétention entre le sommet du pic du méthane et le sommet du pic de l'alcane normal dont le temps de rétention est immédiatement inférieur à celui du pic considéré. Soit d'_n cette différence, en millimètres.

Calculer la différence des distances de rétention entre le sommet du pic du méthane et le sommet du pic de l'alcane normal dont le temps de rétention est immédiatement supérieur à celui du pic considéré. Soit d'_{n+1} cette différence, en millimètres.

9.1.2 Opération effectuée en programmation de température linéaire dès l'injection

Mesurer la distance sur la ligne de base entre le sommet du pic dont il faut déterminer l'indice de rétention, et le sommet du pic de l'alcane normal (n atomes de carbone) dont le temps de rétention est immédiatement inférieur à celui du pic considéré. Soit Δ_x cette distance, en millimètres.

Mesurer la distance sur la ligne de base entre les sommets des pics de l'alcane normal inférieur avoisinant (n atomes de carbone) et l'alcane normal ($n+1$ atomes de carbone) dont le temps de rétention est immédiatement supérieur à celui du pic considéré. Soit Δ_y cette distance, en millimètres.

9.2 Calcul de l'indice de rétention

9.2.1 Conditions isothermes

Calculer l'indice de rétention, I , à l'aide de la formule

$$I = 100 \frac{\log d'_x - \log d'_n}{\log d'_{n+1} - \log d'_n} + 100 n$$

où

d'_x est la distance, en millimètres, entre le sommet du pic dont il faut calculer l'indice de rétention, et le sommet du pic dit de l'air (ou le pic du méthane) (voir 9.1.1);

d'_n est la distance, en millimètres, entre le sommet du pic de l'alcane normal à n atomes de carbone, et le sommet du pic dit de l'air (ou le pic du méthane) (voir 9.1.1);

d'_{n+1} est la distance, en millimètres, entre le sommet du pic de l'alcane normal à $(n+1)$ atomes de carbone, et le sommet du pic dit de l'air (ou le pic du méthane) (voir 9.1.1).

NOTE — Pour que les calculs soient valables, il faut que $d'_{n+1} > d'_x > d'_n$.

9.2.2 Opération effectuée en programmation de température linéaire dès l'injection

Ce calcul n'est valable que pour les composés dont les temps de rétention sont compris dans la zone linéaire de programmation.

Calculer l'indice de rétention, I , à l'aide de la formule

$$I = 100 \frac{\Delta_x}{\Delta_y} + 100 n$$

où

Δ_x est la distance, en millimètres, entre le sommet du pic dont il faut calculer l'indice de rétention, et le sommet du pic de l'alcane normal à n atomes de carbone (voir 9.1.2);

Δ_y est la distance, en millimètres, entre le sommet du pic de l'alcane normal à n atomes de carbone, et le sommet du pic de l'alcane normal à $(n+1)$ atomes de carbone (voir 9.1.2).

NOTE — Si des programmes mixtes de températures ont été effectués, il n'est pas possible de calculer l'indice de rétention.

10 Méthodes de dosage

10.1 Conditions générales

10.1.1 Chromatogramme de l'huile essentielle

Préparer le chromatogramme comme le précise la Norme internationale particulière.

Les conditions de température et de débit doivent être les mêmes que celles utilisées pour l'essai d'efficacité de la colonne (voir 8.2).

Dans certaines déterminations de composants spécifiques, la Norme internationale particulière peut prescrire d'opérer en isotherme, à une température spécifiée. Dans ces cas, le débit doit être réglé de telle sorte que l'on obtienne la séparation indiquée dans la Norme internationale particulière.

Après stabilisation de la température de la colonne, injecter une quantité appropriée de la prise d'essai (de l'ordre de 10^{-6} g).

On obtient le chromatogramme «A».

10.2 Méthode de l'étalon interne

Réaliser successivement le chromatogramme de l'huile essentielle et celui de l'étalon interne (4.5) en utilisant les mêmes conditions opératoires. Vérifier sur les chromatogrammes, d'une part, que les produits à doser sont séparés des autres constituants de l'huile essentielle et, d'autre part, que l'étalon interne n'interfère avec aucun constituant de l'huile essentielle.

10.2.1 Détermination du coefficient de réponse

Si, pour des dosages quantitatifs, on doit déterminer le coefficient de réponse d'un composé par rapport à l'étalon interne, peser une certaine quantité de l'étalon interne (4.5) et de la substance de référence (4.4) dans des proportions telles que les aires correspondantes des pics soient approximativement égales.

Si un solvant doit être utilisé, il doit être indiqué dans la Norme internationale particulière.

Après stabilisation de la température de la colonne, injecter une quantité appropriée de ce mélange, et effectuer l'analyse dans les conditions précisées en 10.1.1.

On obtient le chromatogramme «F».

Calculer le coefficient de réponse, K , du composé par rapport à l'étalon interne, à l'aide de la formule

$$K = \frac{A_E \times m_R}{A_R \times m_E}$$

où

A_R est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant à la substance de référence dont il faut calculer le coefficient de réponse;

A_E est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant à l'étalon interne;

m_R est la masse, en milligrammes, de la substance de référence;

m_E est la masse, en milligrammes, de l'étalon interne.

10.2.2 Dosage

Si la Norme internationale particulière prescrit l'emploi d'un étalon interne, préparer un mélange en pesant, à 0,001 g près, des quantités appropriées de l'huile essentielle et de l'étalon interne. Choisir la quantité d'étalon interne de façon que l'aire du pic du composé à doser et celle de l'étalon interne soient approximativement égales.

Après stabilisation de la température de la colonne, injecter une quantité appropriée de ce mélange (de l'ordre de 10^{-6} g), et effectuer l'analyse dans les conditions précisées en 10.1.1.

On obtient le chromatogramme «C».

10.3 Méthode par addition

Si, pour un dosage particulier, la méthode de l'étalon interne ne peut être utilisée, employer la méthode par addition.

Pour cela, injecter une quantité appropriée de l'huile essentielle étudiée dans laquelle X est le composé à doser, et Y un composé voisin sur le chromatogramme «D» obtenu.

Puis préparer, en pesant à 0,001 g près, un mélange de m grammes d'huile essentielle, et de m_R grammes de substance de référence (4.4) correspondant au composé X à doser.

Injecter ce mélange.

On obtient le chromatogramme «E».

10.4 Méthode de normalisation interne

Cette méthode ne doit pas être assimilée à une vraie méthode de dosage. Elle permet seulement d'estimer grossièrement la concentration relative des différents composés élués d'un mélange par comparaison des aires de leurs pics, et non par un pourcentage en masse.

11 Expression des résultats

11.1 Méthode de l'étalon interne

Calculer la teneur, c_X , exprimée en pourcentage en masse, en composé à doser, à l'aide de la formule

$$c_X = \frac{A_X \times m_E \times K}{A_E \times m} \times 100$$

où

A_X est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant au composé à doser (voir 10.2.2);

A_E est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant à l'étalon interne (voir 10.2.2);

m est la masse, en milligrammes, de l'huile essentielle;

m_E est la masse, en milligrammes, de l'étalon interne;

K est le coefficient de réponse du composé à doser par rapport à l'étalon interne (voir 10.2.1).

11.2 Méthode par addition

Calculer la teneur, c_X , exprimée en pourcentage en masse, en composé à doser, à l'aide de la formule

$$\frac{m_R}{m} \times \frac{r}{r' - r} \times 100 \quad (r' > r)$$

où

m_R est la masse, en grammes, de la substance de référence (4.4);

m est la masse, en grammes, de l'huile essentielle;

et

$$r = \frac{A_X}{A_Y}$$

A_X étant l'aire du pic correspondant au composé X sur le chromatogramme «D» (voir 10.3);

A_Y étant l'aire du pic correspondant au composé Y, voisin de X sur le chromatogramme «D»;

et

$$r' = \frac{A'_X}{A'_Y}$$

A'_X étant l'aire du pic correspondant au composé X sur le chromatogramme «E» (voir 10.3);

A'_Y étant l'aire du pic correspondant au composé Y, voisin de X sur le chromatogramme «E».

11.3 Méthode de normalisation interne

Lorsque la prise d'essai est entièrement volatile (huile essentielle sans résidu fixe) dans les conditions de l'essai, et que le chromatogramme obtenu ne présente pas trop de petits pics, calculer la teneur, c_X , exprimée en pourcentage, en composé à doser, à l'aide de la formule

$$\frac{A_X}{\sum A} \times 100$$

où

A_X est l'aire du pic, en unités d'intégrateur, correspondant au composé à doser;

$\sum A$ est la somme des aires, en unités d'intégrateur, de la totalité des pics.

11.4 Résultats et répétabilité

Prendre comme résultats pour le coefficient de réponse K et pour la teneur en composé à doser c_X les valeurs moyennes de plusieurs essais (au moins trois) effectués sur le même échantillon. Les différentes valeurs prises en considération pour calculer ces moyennes ne doivent pas s'écarter au-delà d'un certain pourcentage de celles-ci (en principe $\pm 2,5 \%$). Ce pourcentage et le nombre d'essais doivent être spécifiés dans les différentes méthodes d'essai ou Normes internationales particulières.

12 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit contenir les indications suivantes:

- a) identification de l'échantillon;
- b) référence à la présente Norme internationale;
- c) type de l'appareil;
- d) caractéristiques de la colonne (matériau, longueur, diamètre intérieur, phase stationnaire et support, et le rapport de la phase stationnaire au support, granulométrie du support, température de la colonne ou programmation de température);
- e) caractéristiques du système d'injection (type et température);
- f) caractéristiques du détecteur (type et température);
- g) type et débit du gaz vecteur;
- h) caractéristiques de l'enregistreur (hauteur maximale du signal, vitesse de déroulement du papier, temps de réponse pleine échelle);
- i) résultats obtenus.