

---

---

**Jus de pommes, concentrés de jus de  
pommes et boissons à base de jus de  
pommes — Détermination de la teneur en  
patuline —**

iTeh STANDARD PREVIEW

**Partie 2:**

**Méthode par chromatographie sur couche  
mince**

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9bcf8056-3828-4b64-b636-b118dd96f630/iso-8128-2-1993>

*Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice —  
Determination of patulin content —*

*Part 2: Method using thin-layer chromatography*



## 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 8128-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 3, *Produits dérivés des fruits et légumes*.

L'ISO 8128 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Jus de pommes, concentrés de jus de pommes et boissons à base de jus de pommes — Détermination de la teneur en patuline*:

- *Partie 1: Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance*
- *Partie 2: Méthode par chromatographie sur couche mince*

L'annexe A de la présente partie de l'ISO 8128 est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1993

Droits de reproduction réservés. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

# Jus de pommes, concentrés de jus de pommes et boissons à base de jus de pommes — Détermination de la teneur en patuline —

## Partie 2:

### Méthode par chromatographie sur couche mince

#### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 8128 prescrit une méthode par chromatographie sur couche mince (CCM), pour la détermination de la teneur en patuline dans les jus de pommes, les concentrés de jus de pommes et les boissons à base de jus de pommes.

La méthode a une limite de détection de 25 µg/l basée sur 50 ml de jus de pommes prêt à la consommation.

NOTE 1 Si l'on souhaite obtenir des résultats d'analyse plus précis, ou en cas de litige, il convient d'utiliser la méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance faisant l'objet de l'ISO 8128-1.

#### 2 Principe

Extraction de la patuline dans un mélange d'acétate d'éthyle-chloroforme (3:2 en volume). Filtration de l'extrait sur une colonne de gel de silice et estimation qualitative et semi-quantitative par chromatographie sur couche mince bidirectionnelle (CCM). Les taches sont développées par emploi d'une solution de chlorhydrate d'hydrazone de 3-méthyl-2-benzothiazoline (MBTH).

#### 3 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

**AVERTISSEMENT — Des précautions particulières doivent être prises lors de l'utilisation du benzène**

ou du chloroforme en raison de leur toxicité et des risques d'explosion qu'ils peuvent entraîner.

**3.1 Solvants**, acétate d'éthyle, chloroforme et toluène.

**3.2 Solvants de développement**, pour la CCM bidirectionnelle:

mélange de benzène/méthanol/acide acétique (80 % en masse) (19:2:1 en volume);

mélange de toluène/acétate d'éthyle/acide formique (90 % en masse) (5:4:1 en volume).

**3.3 Gel de silice**, pour chromatographie sur colonne, de 0,063 mm à 0,2 mm de granulométrie.

**3.4 Solution d'éluion**, mélange de toluène/acétate d'éthyle (75:25 en volume).

**3.5 Solution étalon de patuline** (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>).

##### 3.5.1 Préparation

Peser, à 0,1 mg près, 10,0 mg de patuline, dans une fiole jaugée de 100 ml et les dissoudre dans 100 ml d'acétate d'éthyle (3.1). Ajuster au trait repère avec de l'acétate d'éthyle.

Transférer, à l'aide d'une pipette, 10,0 ml de la solution ainsi obtenue dans une autre fiole jaugée de 100 ml et ajuster au trait repère avec de l'acétate d'éthyle.

La teneur en patuline de cette solution étalon est de 10 µg/ml approximativement.

Mesurer l'absorbance à 276 nm de cette solution étalon à l'aide d'un spectromètre approprié, avec des cellules en quartz présentant un parcours optique de 10 mm.

NOTE 2 Le mode de préparation de la solution étalon ainsi que la vérification de sa pureté sont basés sur la référence [3].

### 3.5.2 Calcul de la concentration

Calculer la concentration,  $\rho_{ps}$ , exprimée en microgrammes par millilitre, de la solution de patuline (3.5.1) à l'aide de l'équation

$$\rho_{ps} = \frac{A \times M_r \times 1\,000 \times C}{A_{276}}$$

où

- A est l'absorbance de la solution étalon de patuline;
- $A_{276}$  est l'absorbance de la solution de patuline, au maximum d'absorption de 276 nm (voir note 3).
- $M_r$  est la masse moléculaire relative de la patuline;
- C est la constante de l'appareil (1 en général).

NOTE 3 Le coefficient d'absorption moléculaire de la patuline mesuré à 276 nm, est égal à  $14\,600$ .

### 3.6 Solution de chlorhydrate de MBTH.

Dissoudre 0,5 g de chlorhydrate d'hydrazone de 3-méthyl-2-benzothiazoline (MBTH) monohydraté dans 100 ml d'eau.

Placer au réfrigérateur et préparer une nouvelle solution au moins tous les 3 jours.

## 4 Appareillage

Rincer le matériel de laboratoire avant son utilisation avec une solution d'hypochlorite de sodium à 10 g/l.

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

**4.1 Colonnes chromatographiques,** de 300 mm x 22 mm, présentant un réservoir de 250 cm<sup>3</sup> et un robinet d'arrêt, et munies, à une extrémité, d'un disque en verre fritté.

**4.2 Équipement CCM,** réservoirs de développement en verre, lampe UV à ondes longues (360 nm) et pulvérisateur.

### 4.3 Fluorodensitomètre

**4.4 Plaques supports pour CCM,** de 20 cm x 20 cm, recouvertes de gel de silice (3.3) (épaisseur de la couche 0,25 mm), sans indicateur fluorescent.

**4.5 Étuve,** ventilée, pouvant être réglée à 130 °C ± 1 °C.

## 5 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

## 6 Mode opératoire

### 6.1 Préparation de la solution d'essai

Diluer les concentrés de jus de pommes dans l'eau, en utilisant un mélange 1:5 de concentré et d'eau, en volume. Procéder ensuite comme pour les autres produits de la façon suivante.

Extraire 50 ml de l'échantillon pour laboratoire (dilué si nécessaire avec de l'eau) avec 50 ml d'un mélange d'acétate d'éthyle/chloroforme [(3:2 en volume)] pendant au moins 1 min.

Répéter l'extraction deux autres fois avec des portions de 50 ml de mélange d'acétate d'éthyle/chloroforme et filtrer chaque portion sur un entonnoir en verre fritté, contenant une couche de 1 cm de sulfate de sodium anhydre, en recueillant le filtrat directement dans un ballon d'évaporation de 250 ml.

Évaporer sous vide jusqu'à siccité dans un évaporateur à rotation et transférer quantitativement le résidu ainsi obtenu dans une éprouvette graduée de 100 ml, en rinçant le ballon avec quatre portions de 5 ml d'acétate d'éthyle. Diluer à 25 ml avec de l'acétate d'éthyle, puis à 100 ml avec du toluène.

### 6.2 Chromatographie sur colonne

Placer un petit tampon de laine de verre dans le bas de la colonne (4.1), ajouter ensuite 25 ml de toluène. Ajouter une bouillie composée de 15 g de gel de silice (3.3) dans 40 ml de toluène dans la colonne, puis 15 g de sulfate de sodium anhydre et laisser égoutter le solvant jusqu'à ce que la surface du solvant soit de niveau avec le haut du garnissage. Ajouter l'extrait de la prise d'essai dans la colonne et laisser égoutter jusqu'à ce que la surface du solvant soit de niveau avec le haut du garnissage. Éliminer cet éluat. Ajouter 200 ml de la solution d'éluat (3.4) dans la colonne et récupérer l'éluat dans une éprouvette graduée à un débit d'environ 5 ml/min. Évaporer l'éluat jusqu'à environ 2 ml.

Transférer quantitativement l'éluat ainsi concentré dans un tube de 20 ml en employant quatre portions

d'acétate d'éthyle (d'environ 4 ml chacune) et évaporer jusqu'à siccité sous courant d'azote. Dissoudre immédiatement le résidu dans 500 µl d'acétate d'éthyle, étant donné que la patuline n'est pas stable.

### 6.3 CCM

Activer les plaques supports pour CCM préenduites (4.4) à 110 °C pendant 2 h. Déposer, à l'aide d'une pipette capillaire ou d'une microsiringue, une partie aliquote de 20 µl de l'extrait purifié de la prise d'essai (6.2) sur la plaque support à une distance de 2 cm de son bord gauche et à 2 cm de son bord inférieur. Déposer une partie aliquote de 5 µl de la solution étalon de patuline (3.5), sur la plaque support à une distance de 2 cm de son bord droit et à 2 cm de son bord inférieur. Déposer une partie aliquote de 5 µl de solution étalon de patuline à 2 cm du bord gauche et à 2 cm de son bord supérieur. Déposer une partie aliquote de 10 µl de solution étalon de patuline à 2 cm du bord gauche et à 4 cm du bord supérieur (voir figure 1).

Développer le chromatogramme dans la direction I, en utilisant le mélange de benzène/méthanol/acide acétique (3.2) jusqu'à ce que le front du solvant atteigne une distance de 14 cm. Retirer la plaque support du réservoir, sécher à l'air et développer ensuite le chromatogramme dans la direction II en utilisant le mélange de toluène/acétate d'éthyle acide formique (3.2) jusqu'à ce que le front du solvant atteigne une distance de 14 cm. Retirer la plaque support du réservoir et laisser sécher à température ambiante. Pulvériser la plaque support avec de la solution de chlorhydrate de MBTH (3.6) puis sécher dans l'étuve ventilée (4.5) réglée à 130 °C pendant 15 min.

### 6.4 Détermination

Déterminer la quantité de patuline dans l'extrait en comparant l'intensité de fluorescence de la tache jaune-brunâtre de l'extrait à celle d'une tache étalon de référence sous irradiation d'ondes longues UV. Observer la tache de patuline de l'extrait au croisement des lignes perpendiculaires provenant des taches de référence. Si l'intensité de fluorescence donnée par les 20 µl de l'extrait est plus grande que celle des taches étalons de référence, diluer l'extrait avec de l'acétate d'éthyle et répéter le mode opératoire CCM prescrit en 6.3. Si l'intensité de fluorescence de la tache de l'extrait est comparable à celle d'une des taches de référence, cela signifie que la concentration de patuline dans l'échantillon analysé est, respectivement, de 25 µg/l ou de 50 µg/l.

NOTE 4 En utilisant la méthode prescrite, on obtient une séparation complète de la patuline du HMF<sup>1)</sup>, de sorte qu'il n'y a aucun risque d'interférence.

1) HMF = hydroxy-5 méthylfurfural

## 7 Calcul

Calculer la teneur en patuline de l'échantillon,  $\rho_p$ , en microgrammes par litre, de la manière suivante:

$$\rho_p = \frac{V_2 \times \rho_{ps} \times V_0}{50 V_1}$$

où

$V_0$  est le volume, en microlitres, de la dilution finale de l'extrait purifié de la prise d'essai;

$V_1$  est le volume, en microlitres, de la tache de la solution d'essai;

$V_2$  est le volume, en microlitres, des taches de la solution étalon de patuline (3.5) donnant une intensité de fluorescence égale à celle donnée par la tache de la solution d'essai;

$\rho_{ps}$  est la concentration, en microgrammes par millilitre, de la solution étalon de patuline.

## 8 Fidélité

Les paramètres statistiques sont exprimés selon l'ISO 5725<sup>[1]</sup>.

### 8.1 Répétabilité

$$r = 33,4; \quad s_r = 29,4$$

où

$r$  est la limite de répétabilité;

$s_r$  est l'écart-type de répétabilité.

### 8.2 Reproductibilité

$$R = 41,0; \quad s_R = 35,8$$

où

$R$  est la limite de reproductibilité;

$s_R$  est l'écart-type de reproductibilité.

## 9 Rapport d'essai

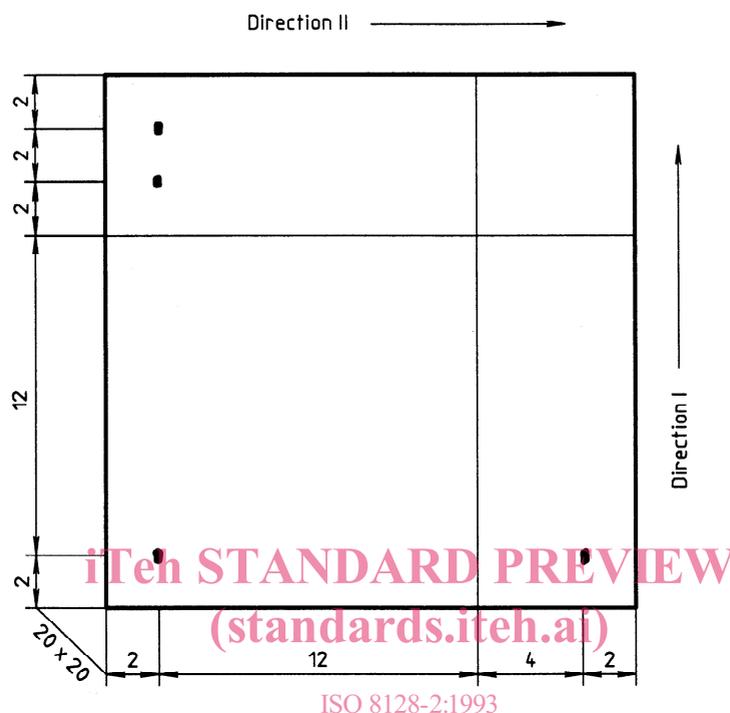
Le rapport d'essai doit indiquer

- la méthode utilisée,
- le résultat obtenu,
- et si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.

Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente partie de l'ISO 8128 ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le résultat.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Dimensions en centimètres



ISO 8128-2:1993  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9bcf8056-3828-4b64-b636-6118dd961630/iso-8128-2-1993>  
**Figure 1 — Chromatographie sur couche mince bidirectionnelle**

## Annexe A (informative)

### Bibliographie

- [1] ISO 5725:1986, *Fidélité des méthodes d'essai — Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais interlaboratoires.*
- [2] ISO 8128-1:1993, *Jus de pommes, concentrés de jus de pommes et boissons à base de jus de pommes — Détermination de la teneur en*
- patuline — Partie 1: Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance.*
- [3] *Official Methods of Analysis*, Vol. 12, Washington DC: AOAC, 1975, p. 463.
- [4] LINDROTH, S. et NISKANWN, A. *J. Food Sci.*, **43**, 446-448 (1978).

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 8128-2:1993](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9bcf8056-3828-4b64-b636-b118dd96f630/iso-8128-2-1993)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9bcf8056-3828-4b64-b636-b118dd96f630/iso-8128-2-1993>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 8128-2:1993

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9bcf8056-3828-4b64-b636-b118dd96f630/iso-8128-2-1993>

---

---

**CDU 663.813:634.11:543.544:632.4**

**Descripteurs:** produit agricole, produit végétal, produit alimentaire, boisson, pomme, jus de fruit et de légume, analyse chimique, dosage, patuline, méthode chromatographique sur couche mince.

Prix basé sur 5 pages

---

---