
**Corps gras d'origines animale et
végétale — Détermination des teneurs en
tocophérols et en tocotriénols — Méthode
par chromatographie en phase liquide à
haute performance**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Animal and vegetable fats and oils — Determination of tocopherols and
tocotrienols contents — Method using high-performance liquid
chromatography*
(standards.iteh.ai)

ISO 9936:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c612b38-d1c7-4f34-81e8-048d0f0ea3cc/iso-9936-1997>



Sommaire

Page

1	Domaine d'application.....	1
2	Référence normative	1
3	Définition.....	1
4	Principe.....	1
5	Réactifs.....	2
6	Appareillage.....	2
7	Échantillonnage	3
8	Préparation de l'échantillon pour essai.....	3
9	Mode opératoire.....	3
10	Expression des résultats	6
11	Fidélité	6
12	Rapport d'essai.....	7
	ISO 9936:1997	
Annexe A	(informative) Saponification.....	8
Annexe B	(informative) Résultats des essais interlaboratoires.....	10
Annexe C	(informative) Bibliographie	11

© ISO 1997

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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
Internet central@iso.ch
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

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 9936 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 11, *Corps gras d'origines animale et végétale*.

[ISO 9936:1997](https://standards.iso.org/iso/9936:1997)

Les annexes A à C de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9936:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c612b38-d1c7-4f34-81e8-048d0f0ea3cc/iso-9936-1997>

Corps gras d'origines animale et végétale — Détermination des teneurs en tocophérols et en tocotriénols — Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour la détermination des teneurs en α -, β -, γ - et δ -tocophérols et tocotriénols libres (appelés globalement tocots) des corps gras et des huiles (appelés globalement corps gras) d'origines animale et végétale, par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP).

Les produits contenant des esters de tocophérols ou de tocotriénols doivent subir une saponification préalable.

NOTE — Une méthode appropriée incluant un processus de saponification à froid, est décrite pour information, dans l'annexe A.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

2 Référence normative

[ISO 9936:1997](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c612b38-d1c7-4f34-81e8-74ad10ba1cc/iso-9936-1997>

La norme suivante contient 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, l'édition indiquée était 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 l'édition la plus récente de la norme indiquée 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 végétal — Préparation de l'échantillon pour essai.*

3 Définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante s'applique.

3.1 teneurs en tocots: Fractions massiques des différents tocots, déterminées suivant la méthode prescrite dans la présente Norme internationale.

NOTE — Ces teneurs sont exprimées en microgrammes par gramme.

4 Principe

Dissolution d'une prise d'essai et séparation des différents tocots par chromatographie en phase liquide à haute performance. Calcul des teneurs en tocots à l'aide de facteurs d'étalonnage déterminés à partir de solutions étalons.

5 Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité CLHP ou équivalente.

5.1 Étalons α -, β -, γ et δ -tocophérol et d' α -, β -, γ et δ -tocotriénol.

5.1.1 Si l'on ne dispose pas d'étalons pour les tocophérols, il est possible d'obtenir des chromatogrammes contenant des pics d' α -, β -, γ et δ -tocophérols à partir d'un mélange d'huile de germes de blé et de graines de soja.

5.1.2 Si l'on ne dispose pas d'étalons pour les tocotriénols, on peut utiliser de l'huile pour identifier les α - et γ -tocotriénols. Les chromatogrammes obtenus peuvent aider à l'identification des pics sur les chromatogrammes obtenus à partir des échantillons pour essai, auquel cas les facteurs d'étalonnage correspondant aux différents tocotriénols seront utilisés.

NOTE — On peut se procurer les étalons β -, γ et δ -tocophérol auprès de la société Merck et ceux d' α -tocophérol auprès de différents fournisseurs. Une certaine variabilité de la pureté des étalons du commerce, qui peut aller de 85 % à 100 %, a été signalée dans plusieurs cas. Ceci confirme l'importance de la détermination, par spectrométrie UV, de la concentration des solutions d'étalonnages préparées.

5.2 Méthanol.

5.3 Dichlorométhane.

5.4 *n*-Hexane.

5.5 Propanol-2.

5.6 Phase mobile pour colonne CLHP, solution à 0,5 % (V/V) de propanol-2 dans le *n*-hexane.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

6 Appareillage

ISO 9936:1997

Toute la verrerie de laboratoire utilisée doit avoir une activité actinique faible et l'appareillage ne doit pas induire de réaction basique (sauf si les solutions sont protégées par addition de pyrogallol).

Matériel courant de laboratoire, et en particulier, ce qui suit:

6.1 Système CLHP, comprenant une pompe haute-pression, un dispositif d'injection de l'échantillon, un spectromètre à fluorescence dont la longueur d'onde d'excitation est réglée sur 290 nm et la longueur d'onde d'émission sur 330 nm, et un enregistreur graphique ou un intégrateur enregistreur.

NOTE — Si l'on ne dispose pas d'un spectromètre à fluorescence, il est admis, mais non recommandé, d'utiliser un spectromètre ultraviolet (UV). La longueur d'onde du spectromètre UV doit être réglée sur 292 nm.

6.2 Colonne analytique pour CLHP, 250 mm × 4 mm, remplie de microparticules de silice d'un diamètre moyen d'environ 5 μ m.

NOTES

1 Le LiChrosob SI 60 et le Spherisorb S5W¹) (diamètre 5 μ m), disponibles dans le commerce conviennent pour le remplissage de la colonne.

2 On peut adapter la longueur et le diamètre de la colonne, en fonction de la technique CLHP employée.

3 L'état de la colonne (antécédents, sécheresse ou présence d'eau entraînant la désactivation, etc.) peut parfois induire l'apparition d'un pic de triacylglycérol se superposant au pic d' α -tocophérol.

Dans ce cas, l'utilisation d'un spectromètre à fluorescence (possibilité d'annulation) ou d'un spectromètre UV (perturbation du pic) peut conduire à des résultats différents. Ce problème lié au choix du spectromètre sera d'autant plus sensible si, en outre, l'instrument est étalonné avec une solution ne contenant pas de corps gras, alors que l'analyse porte sur des échantillons contenant des corps gras.

1) 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.

6.3 Spectromètre UV, permettant le mesurage absolu de l'absorbance à des longueurs d'onde précisément définies.

6.4 Évaporateur rotatif.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 555 [2].

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

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Dans le cas d'échantillons pour laboratoire liquides, l'échantillon pour essai doit être préparé par homogénéisation, comme décrit dans l'ISO 661, en omettant toutefois la filtration.

Dans le cas d'échantillons solides, placer une portion représentative de l'échantillon pour laboratoire (c'est-à-dire au moins égale à 10 % en masse de l'échantillon pour laboratoire) dans un bécher en verre et homogénéiser soigneusement en laissant fondre, dans un bain d'eau réglé à une température inférieure à 40 °C, tout en mélangeant doucement.

Dans la mesure du possible, préparer l'échantillon en lumière atténuée, mais en aucun cas, à la lumière du jour directe.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 9936:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c612b38-d1c7-4f34-81e8-048d0f0ea3cc/iso-9936-1997)

9 Mode opératoire <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c612b38-d1c7-4f34-81e8-048d0f0ea3cc/iso-9936-1997>

NOTE — L'oxydation des tocols au cours de l'analyse conduit en général à l'obtention de résultats anormalement faibles. L'oxydation par l'oxygène pouvant être accélérée par la présence de substances basiques, la chaleur ou l'exposition à la lumière, il convient de prendre les mesures nécessaires pour empêcher l'action de ces facteurs.

9.1 Préparation des solutions d'étalonnage

9.1.1 Solutions étalons mères

Préparer une solution étalon mère de chacun des tocols: peser 10 mg ± 1 mg de l'étalon (5.1) et les placer dans une fiole jaugée de 100 ml, puis compléter jusqu'au trait avec de l'hexane (5.4).

Transférer à la pipette 10 ml de cette solution dans un ballon à fond rond en verre ambré et éliminer totalement l'hexane dans un évaporateur rotatif (6.4), sous vide et à température inférieure ou égale à 40 °C. Rétablir la pression atmosphérique avec de l'azote et sortir le ballon de l'évaporateur dès élimination complète du solvant. Introduire à la pipette 10 ml de méthanol (5.2) dans le ballon et remuer pour dissoudre le résidu. Mesurer l'absorbance de cette solution à la longueur d'onde convenable, dans le spectromètre (6.3), et calculer la concentration (en microgrammes par millilitre) en divisant la valeur de l'absorbance par le facteur convenable donné dans le tableau 1.

Tableau 1 — Facteurs de division

Longueur d'onde nm	Tocophérol	Facteur de division
292	α -tocophérol	0,007 6
296	β -tocophérol	0,008 9
298	γ -tocophérol	0,009 1
298	δ -tocophérol	0,008 7

NOTE — Ces facteurs sont calculés à partir de la valeur E (1 %/1 cm) des tocots. La valeur E (1 %/1 cm) de l' α -tocophérol, par exemple, est égale à 76 à 292 nm (dans le méthanol). Une solution à 1 $\mu\text{g/ml}$ d' α -tocophérol aura donc une absorbance de 0,007 6 à 292 nm.

9.1.2 Solutions étalons de travail

Mélanger des volumes convenables des solutions étalons mères (9.1.1) pour préparer une solution étalon de travail contenant un mélange de tocots, et diluer avec du n -hexane de façon que la concentration de chacun des constituants étalons de cette solution soit comprise entre 1 $\mu\text{g/ml}$ et 5 $\mu\text{g/ml}$.

Il faut préparer chaque jour une nouvelle solution étalon de travail.

Protéger les étalons de toute exposition à la lumière et les stocker à température comprise entre 0 °C et 4 °C.

NOTES

- 1 Les solutions étalons mères se conservent convenablement pendant 1 semaine si elles sont réfrigérées et stockées dans des fioles en verre ambré à faible activité actinique. Les fioles peuvent être enveloppées dans des feuilles d'aluminium.
- 2 Si l'on utilise un spectromètre UV, il peut être nécessaire de travailler sur des solutions plus concentrées.

9.2 Optimisation des paramètres de travail

9.2.1 Si la colonne (6.2) est neuve ou son historique inconnu, ou si, pour une autre raison, il est nécessaire de la conditionner, de la laver et de la préparer pendant environ 10 min au méthanol, puis au dichlorométhane, puis au n -hexane sous débit de 1 ml/min environ.

Utiliser la pompe pour faire circuler la phase mobile (5.6) dans la colonne à un débit de 1 ml/min, pendant au moins 30 min.

AVERTISSEMENT — Le méthanol et le dichlorométhane sont des produits dangereux pour l'homme et l'environnement. Ils doivent être manipulés avec précaution.

9.2.2 Injecter, dans la colonne, environ 20 μl de la solution étalon de travail (9.1.2) et, si nécessaire, ajuster la teneur en propanol-2 de la phase mobile et le débit pour que les conditions suivantes soient réalisées:

- a) temps de rétention de l' α -tocophérol égal ou supérieur à 5 min;
- b) résolution R_s relative à la séparation des β - et γ -tocophérols égale ou supérieure à 1,0 c'est-à-dire séparation des pics presque au niveau de la ligne de base.

La résolution R_s se calcule d'après la formule

$$R_s = \frac{d_r(I) - d_r(II)}{0,5[b(I) + b(II)]}$$

où

$d_r(I)$ est la distance de rétention du γ -tocophérol;

$d_r(II)$ est la distance de rétention du β -tocophérol;

$b(I)$ est la largeur à la base du pic du γ -tocophérol;

$b(II)$ est la largeur à la base du pic du β -tocophérol.

NOTE — L'emploi comme phase mobile de 5 % de 1,4-dioxane dans le *n*-hexane permet aussi de séparer le γ -tocophérol et le β -tocotriénol.

9.2.3 Régler la sensibilité et la vitesse d'enregistrement du détecteur et de l'intégrateur sur sa valeur optimale. Injecter environ 20 μ l de la solution étalon de travail (9.1.2). Répéter l'injection et vérifier la reproductibilité des chromatogrammes obtenus.

NOTES

1 On sait par expérience, que pour la phase mobile, un débit compris entre 0,7 ml/min et 1,5 ml/min est satisfaisant. Il est déconseillé de travailler à des valeurs supérieures, surtout si l'on utilise un spectromètre UV, car la qualité de la chromatographie peut en être affectée.

2 Il est normalement possible d'obtenir une efficacité, calculée sur le pic du δ -tocophérol, de 10 000 plateaux par mètre. L'efficacité *n* de la colonne, en nombres de plateaux par mètre, peut se calculer d'après la formule

$$n = 5,54 \left[d_r(III) / b_{0,5}(III) \right]^2$$

où

$d_r(III)$ est la distance de rétention du δ -tocophérol;

$b_{0,5}(III)$ est la largeur du pic à mi-hauteur du δ -tocophérol.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9936:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c612b38-d1c7-4f34-81e8-048d0f0ea3cc/iso-9936-1997>

9.3 Préparation de la solution d'essai

Selon la concentration de tocots (9.1.2), peser, à 1 mg près, 2 g \pm 0,1 g de l'échantillon pour essai (article 8) et les placer dans une fiole jaugée de 25 ml. Ajouter du *n*-hexane (5.4), remuer pour dissoudre le résidu, puis compléter jusqu'au trait avec le même solvant.

NOTE — Il peut être nécessaire de procéder à une nouvelle dilution avant l'analyse chromatographique.

Il est important d'éviter toute exposition à la lumière des solutions d'essai avant l'analyse, qui doit être effectuée le jour même de la préparation.

9.4 Détermination

9.4.1 Injecter, dans la colonne, 20 μ l de la solution étalon de travail (9.1.2) et noter la surface des pics ou, si l'on ne dispose pas d'un intégrateur, leur hauteur (mesurée en millimètres).

9.4.2 Injecter, dans la colonne, 20 μ l de la solution d'essai (9.3) et identifier les tocots présents par comparaison avec les chromatogrammes d'étalonnage. Noter la surface (ou la hauteur) des pics. Procéder à une nouvelle injection de solution d'essai et à un nouveau mesurage. Prendre pour résultat de la détermination la moyenne des deux valeurs obtenues.

Injecter à nouveau 20 μ l de la solution étalon de travail (9.1.2) et noter la surface des pics.